

# **Karcinogenezisben szerepet játszó allélpolimorfizmusok a magyarországi roma populációban**

**Doktori (PhD) értekezés**

**Orsós Zsuzsanna**

**Programvezető: Prof. Dr. Ember István**

**Témavezető: Prof. Dr. Ember István**

**Pécsi Tudományegyetem**

**Általános Orvostudományi Kar**

**Pécs, 2013**

# I.Bevezetés

## I.1. A cigányság, a romák főbb csoportjai, etnográfia, demográfia

Európa legnagyobb, 10-12 millió főt magába foglaló etnikai kisebbségét a roma / cigány populáció képezi (Kalaydjieva, 2001). A kettős elnevezés abból ered, hogy a „cigány” szó a különböző nyelvekben gyakran előítéletet hordoz és diszkriminatív kifejezésnek minősül, ezért az 1971-ben, Londonban megrendezésre került első Roma Világkongresszuson a számos ország által delegált szervezetek képviselőinek döntése alapján a nép neve egységesen „roma” (romani) lett (<http://romediafoundation.wordpress.com>). A romák Észak-, illetve Északnyugat-Indiából származnak, ahonnan hosszú vándorlás után, mintegy 1000 évvel ezelőtt érhatték el Európát (Gresham, 2001). Attól függetlenül, hogy a többségi társadalom számára a romák egy etnikai csoportot jelentenek, meg kell jegyezni, hogy az ebbe a közösségbe tartozók valójában nem alkotnak egységes csoportot. A cigány közösségekbe tartozók egyik legmarkánsabb sajátossága az általuk beszélt nyelv. Ezek alapján, Magyarországon ma három nagyobb, egymással nem szívesen keveredő roma közösség különíthető el. A legnépesebb csoportot (kb. 70%) az ún. magyar cigányok („romungró” vagy muzsikus cigányok) alkotják, akik ma már csak a magyar nyelvet beszélik. A hazai cigányság körülbelül 20%-át az „oláh” (vlax) cigányok (kolompárok) képezik. Túlnyomó részük az oláh cigány nyelv lovári változatát beszéli a magyar mellett. A lovári nyelv, mint hivatalos cigány nyelv, élénken él e közösség tagjai között. Jóval kisebb csoportot képeznek a román területekről érkező „beás” cigányok, akik a román nyelv archaikus dialektusát használják. Főként a Dunántúlon élő beásokra jellemző, hogy a tradicionálisan a családi környezetben használt beás nyelvet az újabb generációk egyre kevésbé beszélik, így azt a kihalás veszélyezteti.

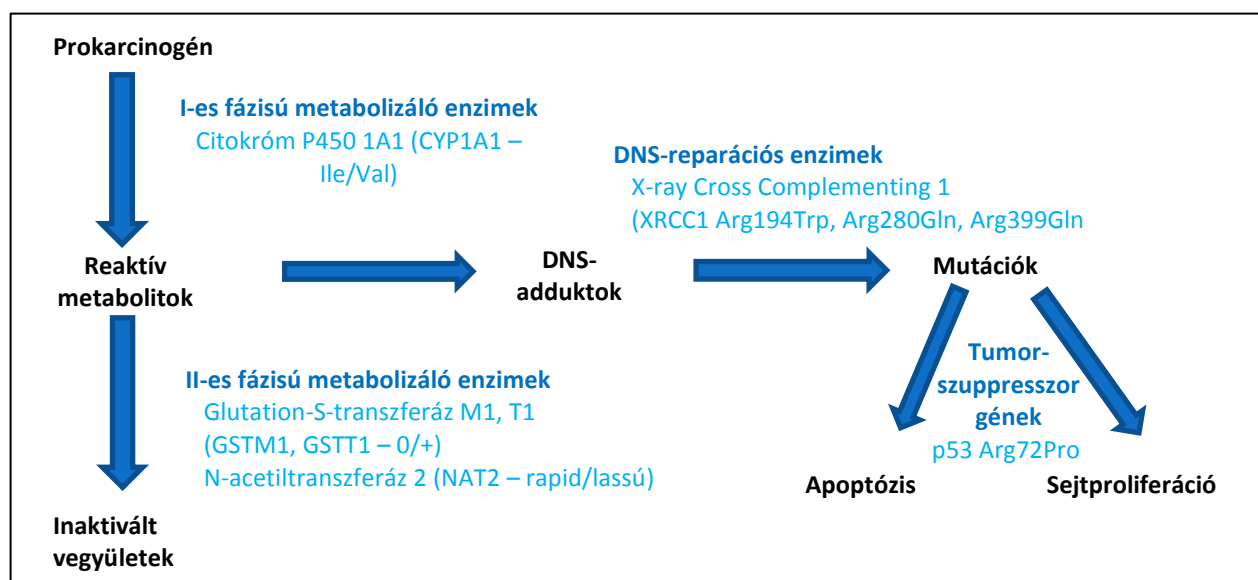
2011-ben a népszámláláskor 315.583 fő vallotta magát ebbe az etnikai csoportba tartozónak, ez Magyarország lakosságának 3,2%-át tette ki. Probléma, hogy nem könnyű definiálni, hogy ki a cigány. Jogilag csak azokat a személyeket tekinthetjük romának aki, annak vallja magát, de a cigányoknak mondott társadalmi csoportok tagjait érő számtalan előítélet miatt sokan egyre kevésbé vállalják fel származásukat (Ladányi, 2004; Tomka, 1991). A társadalomkutatók és szociológusok egyetértenek abban, hogy a cigányság valós száma jóval magasabb, mint amit az önbevalláson alapuló népszámlálási adatok mutatnak (Kemény, 2004; Puporka, 1999). Speciális becslés-sorozatok alapján a romák valós száma 2009-ben mintegy 640.000 fő volt (összlakosság 6-7%-a, Habcsek, 2007). A roma közösségek demográfiai jellemzői erőteljesen eltérnek a magyarországi nem roma populációtól, természetes népmozgalmi mutatóik (pl. fiatal korösszetétel, magas termékenység, magas halandóság, alacsony születéskor várható élettartam) a demográfiai átmenet stádiumában lévő populációkra jellemzők (Habcsek, 2007). Az elkövetkező időszakban a roma populáció minden korcsoportjában jelentős létszámnövekedés várható.

## I.2. A romák egészségi állapota

Bár a romák nem képeznek egységes csoportot, a publikált eredmények megegyeznek abban, hogy egészségi mutatóik egységesen és jelentősen eltérnek a többségi társadalomhoz tartozó, nem roma populációtól. A születéskor várható átlagos élettartam körülbelül 10-15 évvel a

többségi társadalomban mért életkor alatt marad (Bogdanović, 2007; Kósa, 2002; Koupilova, 2001). Az iparilag fejlett országokban a mortalitás fő okát a nem fertőző betegségek képezik. Daganatokra vonatkozólag a Delphoi Consulting 2004-es vizsgálata szerint a magyarországi cigányok körében a daganatos halálozások 1,8-szer gyakoribbak a nem romákénál (Delphoi Consulting, 2004; Babusik, 2005).

A daganatok etiológiájában mind a környezeti, mind a genetikai tényezők nagy szereppel bírnak. A cigányság vonatkozásában hiányoznak azok a vizsgálatok, amelyek a daganatok kialakulásában népegészségügyi szempontból fontos genetikai tényezők szerepét kutatnák. A kifejezetten örökletes betegségeket okozó, magas penetranciájú genetikai tényezők által okozott populációs járulékos kockázati többlet alacsony, e tényezők viszonylag ritka előfordulásának következményeképp. Ha a populációs szintű incidenciát illetve mortalitást komolyabban befolyásoló tényezőket szeretnénk vizsgálni, akkor az úgynevezett „egyéni érzékenység” jellegű faktorokat kell tanulmányoznunk, amelyek tipikusan a daganatok kockázatát kisebb mértékben befolyásoló, de általánosan jelen levő allélpolimorfizmusok. Vizsgálatunkban a ritka, örökletes szindrómák, illetve ezekért felelős mutációk vizsgálata helyett azokat a magas járulékos populációs kockázattal bíró génpolimorfizmusokat tanulmányoztuk, amelyek általánosan elterjedtek a populációban. Igyekeztünk a korai karcinogenezis folyamatát legpontosabban modellezni, a xenobiotikumok biotranszformációjában, a DNS hibajavító mechanizmusában és a sejtproliferáció szabályozásában részt vevő gének bevonásával. A kiválasztott allélpolimorfizmusok bizonyítottan befolyásolják a daganatok iránti egyéni érzékenységet, de tudomásunk szerint ezidáig a roma populációra vonatkozóan még nem vizsgálták azokat. Vizsgálati alanyként a roma identitást leginkább megőrző és relatíve nagy lélekszámú oláh cigány populációt választottuk. Az alábbi ábrán összefoglalva szemléltetjük a korai karcinogenezis folyamatát, az abban kulcsfontosságú szereppel bíró géneket, majd röviden ismertetjük az általunk kiválasztott allélpolimorfizmusokat.



1. ábra: A karcinogenezis korai szakasza, illetve az azokban résztvevő és általunk vizsgálni kívánt gének polimorfizmusai.

### **I.3. A vizsgált genetikai tényezők**

#### ***I.3.1. Citokróm P450 1A1 (CYP1A1) – Ile/Val polimorfizmus***

A CYP1A1 – mint I-fázisú metabolizáló enzim – a szervezetbe került kémiai vegyületek átalakítása során gyakran az eredeti komponensnél jóval toxikusabb metabolitokat hoz létre (Nelson, 1996). Szubsztrátjai között számos külső – potenciálisan karcinogén – kémiai vegyület (pl. benzpirén és más policiklusos aromás szénhidrogének) illetve több endogén szubsztrát (pl. szteroid hormonok, zsírsavak) is megtalálható. A CYP1A1 gén funkcionális Ile/Val polimorfizmusáról akkor beszélünk, amikor a 7-es exon területén egy A→G szubsztitúció következtében a vad típusról átíródó izoleucin aminosav (Ile allél) helyett valin (Val allél) keletkezik. A Val allél által kódolt fehérje enzimaktivitása fokozott, tehát hatékonyabban, gyorsabban aktiválja a szervezetbe került potenciális karcinogéneket (Kawajiri, 1993; Hayashi, 1991).

#### ***I.3.2. Glutation-S-transzferáz M1 (GSTM1), Glutation-S-transzferáz T1 (GSTT1) – inszerciós/deléciós polimorfizmus***

A biotranszformáció során a xenobiotikumok reaktív metabolitjai illetve az oxidatív stressz által keletkezett reakciótermékek intracelluláris szintje a II-es fázisú metabolizáló enzimeknek köszönhetően csökken. E detoxikáló folyamatok legjobban ismert képviselői a glutation-S-transzferáz (GST) enzim-szupercsalád tagjai közé tartoznak. A külső kémiai karcinogének, mint például a policiklikus aromás szénhidrogének, 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon, dimetil-benzantracén, metil-kolantrén, benzpirén illetve az epoxidok többségének detoxikálásáért a GST enzimcsalád  $\mu$  (GSTM) és  $\theta$  (GSTT) enzimjei felelősek (Hayes, 2005; Ketterer, 1988). Mind a GSTM1, mind a GSTT1 gének legjelentősebb polimorfizmusa az inszerciós/deléciós (0/+) polimorfizmus. Ebben az esetben a GSTM1 illetve GSTT1 gén egy szakasza hiányozhat, aminek következtében a róla átíródó fehérje nem képes a glutationnal történő konjugációra. Null genotípus esetén mind a két szülői allélről funkcióképtelen enzim íródik át.

#### ***I.3.3. N-acetiltranszferáz 2 (NAT2) – lassú és gyors acetiláló polimorfizmus***

Az N-acetiltranszferázok csoportjába tartozó NAT2 enzim a konkrét szubsztráttól függően akár I-es akár II-es fázisú reakciókat is katalizálhat. A NAT2 részt vesz az aromás aminok és hidrazidok biotranszformációjában. A NAT2 génpolimorfizmusok következtében a génről átíródó enzimek aktivitása eltérő (Borlak, 2006). A vad típusú (NAT2\*4) allél gyors acetiláló képességgel rendelkező enzimet kódol. A nagyszámú polimorfizmus a fenotípusban három formában jelenik meg. Gyors acetilálóknak nevezzük azokat, akik homozigóták a vad típusú allélek tekintetében, míg lassú acetilálóknak nevezzük azokat, akik a variáns allélekre homozigóták. A harmadik fenotípust a közepes acetilálók képezik, náluk az egyik NAT2-allél vad típusú, a másik pedig egy variáns allél. Leegyszerűsítve gyakran csak két kategóriát szoktak megkülönböztetni: a rapid acetilálók akik hordozzák a vad típusú allélt, míg a lassú acetilálóknak csak variáns alléljeik vannak (Seow, 1999).

#### ***1.3.4. Az X-ray repair cross complementing 1 (XRCC1) DNS reparációs gén –***

##### ***Arg194Trp, Arg280His, Arg399Gln polimorfizmusok***

A szervezetbe került karcinogének intracelluláris koncentrációja a metabolizáló enzimek aktivitásának, illetve inaktivitásának függvénye. A hatékony detoxikáló enzimek ellenére is reaktív metabolitok maradnak a sejtben, amelyek reakcióba lépve a makromolekulákkal, adduktokat képeznek. Az ionizáló sugárzások, a dohányzás, az alkohol, az oxidatív stressz okozta sejtkárosodások leggyakrabban egyes szálú lánc töréseket és bázis-sérüléseket okoznak. Ezen DNS-léziók elsődleges javítása a bázisexcíziós repair mechanizmus segítségével történik. A BER mechanizmusban az XRCC1 gén kulcsszereplő. A DNS reparációs mechanizmusban résztvevő gének genetikai polimorfizmusai bizonyítottan befolyásolják a daganatok iránti egyéni érzékenységet (Wu, 2011; Engin, 2011).

#### ***1.3.5. TP53 tumorszuppresszor gén – Arg72Pro polimorfizmus***

A 393 aminosavból álló, igen konzervatív p53 fehérje számos olyan regulációs folyamatban vesz részt, amelyek a sejt integritását igyekeznek megőrizni. A p53 protein G1 fázisban megállítja a sejt ciklust, ezáltal akadályozva meg a károsodott sejt proliferációját. Ekkor a reparációs folyamatokban részt vevő enzimek kijavíthatják a keletkezett hibákat. Ha a DNS-ben létrejött hibák kijavítása nem lehetséges, akkor a p53 apoptózist indukál, így járulva hozzá a szervezet védelméhez. A humán daganatok mintegy 50%-ban figyelhető meg a TP53 gén mutációja (Bennett, 1999). A génnek azonban allélpolimorfizmusai is ismeretesek, legjelentősebb a 72-es kodon területén található Arg/Pro polimorfizmus, amikor a génben egy G→C szubsztitúció miatt arginin helyett prolin íródik át. Ez az aminosavcsere a p53 fehérje transzaktivációs doménjének területére esik, az így expresszálandó p53 fehérje apoptotikus és transzkripciós aktivitása eltér a vad típusú alléltól (Dumont, 2003). Az Arg72Pro polimorfizmus allélgyakoriságai széles variabilitást mutatnak a különböző rasszok/etnikai csoportok között, így felelőssé tehető a daganatok iránti érzékenységekben tapasztalt egyéni, illetve az interetnikai különbségek kialakulásáért is (Wu, 2002).

#### ***1.3.6. mikroRNS-ek – mikroRNS-146a (miR-146a) polimorfizmus***

A humán genom jelentős része mikroRNS reguláció alatt áll (Friedman, 2009), így a daganatok kialakulásában fontos gének is. A funkcionális génekhez hasonlóan, a mikroRNS-eket kódoló génekben is léteznek polimorfizmusok, amelyek khatással vannak az érés folyamatára vagy az érett mikroRNS funkciójára. Ezek az allélpolimorfizmusok még abban az esetben is befolyásolhatják a pre-mikroRNS érését, stabilitását, ha a polimorfizmus az érés során kivágódó területekre esik. A miR-146a target génjei között megtaláljuk a humán karcinogenezis folyamatában igen fontos regulációs szereppel bíró géneket is, így a miR-146a polimorfizmus ugyancsak befolyásolhatja a daganatok kialakulásának kockázatát. Az említett saját pilot tanulmányban a miR-146a rs2910164 polimorfizmus fej-nyaki daganatos kockázatra gyakorolt hatását elemeztük, eset-kontroll vizsgálatban.

## I.4. A fej-nyaki daganatok

Európában 2012-ben a fej-nyaki daganatok tekintetében a legmagasabb mortalitás Magyarországon volt tapasztalható. A fej-nyaki daganatok legjobban ismert kockázati tényezője a dohányzás és az alkoholtartalmú italok túlzott fogyasztása. Hatásuk külön-külön is jelentős, de együttes jelenlétük esetén az ajak- és szájüreg rák kialakulásának esélye megegyezően megnövekszik. A kockázati tényezők közül ki kell emelnünk a rossz- vagy nem megfelelő szájhygiénét. A magas rizikójú HPV-típusok (pl. 16, 18) etiológiai szerepe ma már a fej-nyaki daganatok laphámrák esetén is jól ismert (Kreimer, 2005). A hátrányos helyzetben lévő személyek között a fej-nyaki daganatok incidenciája lényegesen magasabb, hiszen a fent említett kockázati tényezők e közösségek tagjai között halmozottan fordulnak elő. A magas fej-nyaki daganatos halálozások, ill. a romák fokozott veszélyeztetettsége miatt, önálló, külön vizsgálatként iktattuk be – a PhD-munka fő gondolatmenetét lényegében megszakítva – a pre-miR-146a rs2910164 allélpolimorfizmus fej-nyaki daganatok kockázatára gyakorolt hatásának tesztelését. Ezt a vizsgálatot tehát etnikai alapon nem szelektált, „általános” magyar népességben végeztük; előnye, hogy a kérdéses genetikai tényező szerepét a teljes magyar népesség vonatkozásában adja meg.

## II. Célkitűzések

- A magyarországi oláh cigány populáció allélgyakoriságának felmérése néhány, a karcinogenezis folyamatában kulcsfontosságú metabolizáló enzim (CYP1A1, GSTM1, GSTT1, NAT2) allélpolimorfizmusa tekintetében.
- A magyarországi oláh cigány populáció allélgyakoriságának felmérése a karcinogenezis folyamatában kulcsfontosságú XRCC1 DNS reparációs gén allélpolimorfizmusai vonatkozásában.
- A magyarországi oláh cigány populáció allélgyakoriságának felmérése a karcinogenezis folyamatában kulcsfontosságú TP53 tumorsuppresszor gén Arg72Pro allélpolimorfizmusát illetően.
- A pre-miR-146a rs2910164 polimorfizmus hatásának vizsgálata a fej-nyaki daganatok kialakulásának kockázatára.
- A magyarországi oláh cigány populáció allélgyakoriságának felmérése a pre-miR-146a rs2910164 allélpolimorfizmusa tekintetében.
- A fenti allélmegoszlások leírása a hazai nem roma népességben és ezek összevetése a romákban talált gyakoriságokkal, valamint a romák indiai eredete okán irodalmi adatokból származó indiai adatokkal.

## III. Anyag és módszer

### III.1. Résztevők, vizsgálati elrendezés

#### ***III.1.1. Roma és nem roma allélmegoszlások összehasonlítása***

PhD munkámban 195 oláh cigány személy genotipizálását végeztük el. A roma részttevők felkutatása, valamint a vérvétel a Johan Béla Országos Epidemiológiai Központ roma projektje keretében történt, a mintákat dr. Béres Judit bocsátotta rendelkezésünkre. A mintavétel, illetve a vizsgálatok a szükséges etikai engedélyek és a részttevők írásos hozzájárulásának birtokában zajlottak, a részvétel önkéntes volt. Kontrollként 547, magyarországi nem roma populációból származó személy perifériás véréből izoláltunk DNS-t és végeztük el ugyanazon gének allélgyakoriságának vizsgálatát. A roma illetve a többségi társadalomból származó nem roma allélgyakoriságokat a cigányság indiai eredete okán, az irodalomból származó indiai populációkban mért allélgyakoriságokkal is összevetettük (Mittal, 2011; Majumder, 2005; Buch, 2002; Tandle, 2001; Zhao, 1995). A lehetőségeken belül törekedtünk arra, hogy észak-indiai népeiségeken végzett vizsgálati eredményeket vegyünk az összehasonlítás alapjául.

#### ***III.1.2. A fej-nyaki daganatok kockázata és a pre-miR-146a rs2910164 polimorfizmus közötti kapcsolat vizsgálata***

Ezt az eset-kontroll vizsgálatot a roma/nem roma allélmegoszlások összehasonlításától teljesen függetlenül végeztük, célja a pre-miR-146a rs2910164 polimorfizmus fej-nyaki daganatos kockázatra gyakorolt hatásának tisztázása volt, magyar népességben. A részttevők etnikai hovatartozását nem ismertük, illetve nem regisztráltuk, és ilyen szelekciót nem végeztünk. A beteg és a kontroll csoport is 468 főből állt. A kontroll csoport tagjait egyéni szinten illesztettük a betegekhez, életkor ( $\pm 5$  év), nem és dohányzási szokások alapján.

### III.2. Genotipizálás

A perifériás véreket 0,84%-os  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -oldattal való ismételt centrifugálással vvt-mentesítettük, majd a fehérvérsejtekből GenomicPrep (Pharmacia, Uppsala, Svédország) DNS-izoláló kittel, az ott leírt reagensekkel és protokoll alapján DNS-t izoláltunk. A genotipizálásokat az alábbiakban részletezett metodika szerint végeztük.

#### ***III.2.1. CYP1A1 Ile/Val polimorfizmus***

Allélspecifikus polimeráz láncreakció (PCR) segítségével a 7-es exonban lévő Ile/Val polimorfizmus genotípusa meghatározható (Hirvonen, 1992). Ekkor a reakció párhuzamosan zajlik két csőben, amelyben az upstream primer azonos, de a downstream primerek az utolsó bázisban eltérnek egymástól. Az upstream primer szekvenciája: GAAAGGCTGGGTCCACCCTCT, a downstream primerek szekvenciája: AAGACCTCCAGCGGGCAAT<sub>1</sub> AAGACCTCCAGCGGGCAAC<sub>2</sub>. Amplifikáció abban a csőben történik, amelynek downstream primere teljesen komplementer az adott DNS-szakasszal.

### **III.2.2. GSTM1 – GSTT1 szimultán genotipizálás**

A reakcióelegyben mind a GSTM1, mind a GSTT1 specifikus primerek, valamint kontrollként a  $\beta$ -globin gén egy szakaszára specifikus primerek voltak jelen, (Pool-Zobel, 1998). GSTM1-F: GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC, GSTM1-R: GTTGGGCTCAAATATACGGTGG, GSTT1-F: TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC, GSTT1-R: TCACCGGATCATGGCCAGCA,  $\beta$ -globin-F: CAACTTCATCCACGTTACAC,  $\beta$ -globin-R: GAAGAGCCAAGGACAGGTAC. + genotípus esetén az adott fragment amplifikálódik, 0 genotípusnál nincs amplifikáció.

### **III.2.3. NAT2 rapid/lassú acetiláló polimorfizmus**

A PCR amplifikáció után kapott terméket 3 részre osztva 3 különböző restrikciós enzimmal emésztettük (*KpnI*, *TaqI*, és *BamHI*), a leggyakoribb lassú acetiláló genotípusok azonosítására. Az esetek 95%-ában ezen allélek /M1 (*KpnI*), M2 (*TaqI*), M3 (*BamHI*)/ jelenléte felelős a NAT2 alacsony aktivitásáért (lassú acetilálók). Lassú acetilálónak tekintettük a vizsgált személyt, ha a vad típusú allél nem volt jelen, tehát mindkét allélje „lassú” allél volt (Okkels, 1997). Primerek: GGAACAAATTGCACTTGG, TCTAGCATGAATCACTCTGC.

### **III.2.4. XRCC1-DNS reparációs enzim polimorfizmusai**

Az XRCC1 gén variánsait restrikciós fragment hosszúság-polimorfizmus (RFLP) módszerével vizsgáltuk (Xing, 2002, Lee, 2001b, Lunn, 1999). 194-es kodon primerek: 5'-GCC AGG GCC CCT CCT TCA A -3', 3'-TAC CCT CAG ACC CAC GAG T -5', emésztés: *PvuII*, 280-as kodon primerek: 5'-TTG ACC CCC AGT GGT GCT AA -3', 3'-GGC TGG GAC CAC CTG TGT T -5', emésztés: *RsaI*, 399-es kodon primerek: 5'- TTG TGC TTT CTC TGT GTC CA -3', 3'- TCC TCC AGC CTT TTC TGA TA -5', emésztés *MspI*.

### **III.2.5. TP53 Arg72Pro polimorfizmus**

Az allélspecifikus amplifikáció két csőben párhuzamosan, ugyanazzal a 3' primerrel, és az utolsó bázisukban különböző 5' primerekkel történt (Murata, 1996). 3' primer: GCAACTGACCGTGCAAGTCA, 5' primerek: ATGCCAGAGGCTGCTCCCCG, ATGCCAGAGGCTGCTCCCCC.

### **III.2.6. pre-miR-146a rs2910164 polimorfizmus**

A miR-146a genotipizálás a konfrontálódó primer-párok módszerével történt (Hishida, 2011; Hamajima, 2000). A két primer-pár úgy lett megtervezve, hogy az 1. párnál a reverz primer utolsó bázisa, míg a másik primer párnál pedig a forward primer essen a vizsgált SNP helyére. Az első primer az egyik, a második primer a másik alléllal teljesen komplementer, így jelen esetben az alábbi amplifikációs változatokat kapjuk: Mindenképpen keletkezik egy közös, 261 bp hosszúságú fragmentum (1. pár forward és 2. pár reverz primere), a C allélt hordozóknál emellett egy 128 bp fragmentum is jelen lesz (1. primer pár), míg a G allél pedig egy 182 bp hosszúságú terméket generál (2. primer pár). Primerek: F1: AAGCAGCTGCATTGGATT, R1: CAGCTGAAGAACTGAATTTAC, F2: GTTGTGTCACTGTCAGACCTC, és R2: CAAGCTCTTCAGCAGACTGA.

## **III.3. Statisztikai módszerek**

Az allélgyakoriságok összehasonlítása esély-hányados (OR) és 95%-os megbízhatósági tartomány (95% CI) számításával történt, illetve p-értéket is számoltunk a Pearson-féle  $\chi^2$ -próbával. A Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérést  $\chi^2$ -próbával vizsgáltuk. Az eset-kontroll vizsgálatban az életkort Student-féle kétmintás t-próbával, a gyakorisági változókat pedig  $\chi^2$ -próbával hasonlítottuk össze. A rizikófaktorok és a fej-nyaki daganatos kockázat közötti kapcsolatot logisztikus regressziószámítással elemeztük, életkor-, képzettség- és krónikus szájüregi betegségek fennállása szerint igazítva.



## IV. Eredmények

A hazai nem roma populációban talált allélmegoszlásokat összevetettük irodalmi adatok alapján, más európai vagy amerikai populációkon történt vizsgálatok eredményeivel, és azt találtuk, hogy a hazai allélgyakoriságok jól illeszkednek ezekhez az arányokhoz (Piacentini, 2011; Borlak, 2006; Matullo, 2001; Matthias, 1998; Sjölander, 1995). A miR-146a polimorfizmusnál saját eredményeink valamelyest eltértek az USA-ban publikált allélmegoszlásoktól, de nem különböztek statisztikailag szignifikánsan a török népességben talált allélgyakoriságoktól (Permuth-Wey, 2011; Akkiz, 2011). A vizsgált allélmegoszlások vonatkozásában a Hardy-Weinberg egyensúlytól egyik polimorfizmus esetében sem tapasztaltunk statisztikailag szignifikáns eltérést.

### IV.1. Metabolizáló enzimekre vonatkozó eredmények

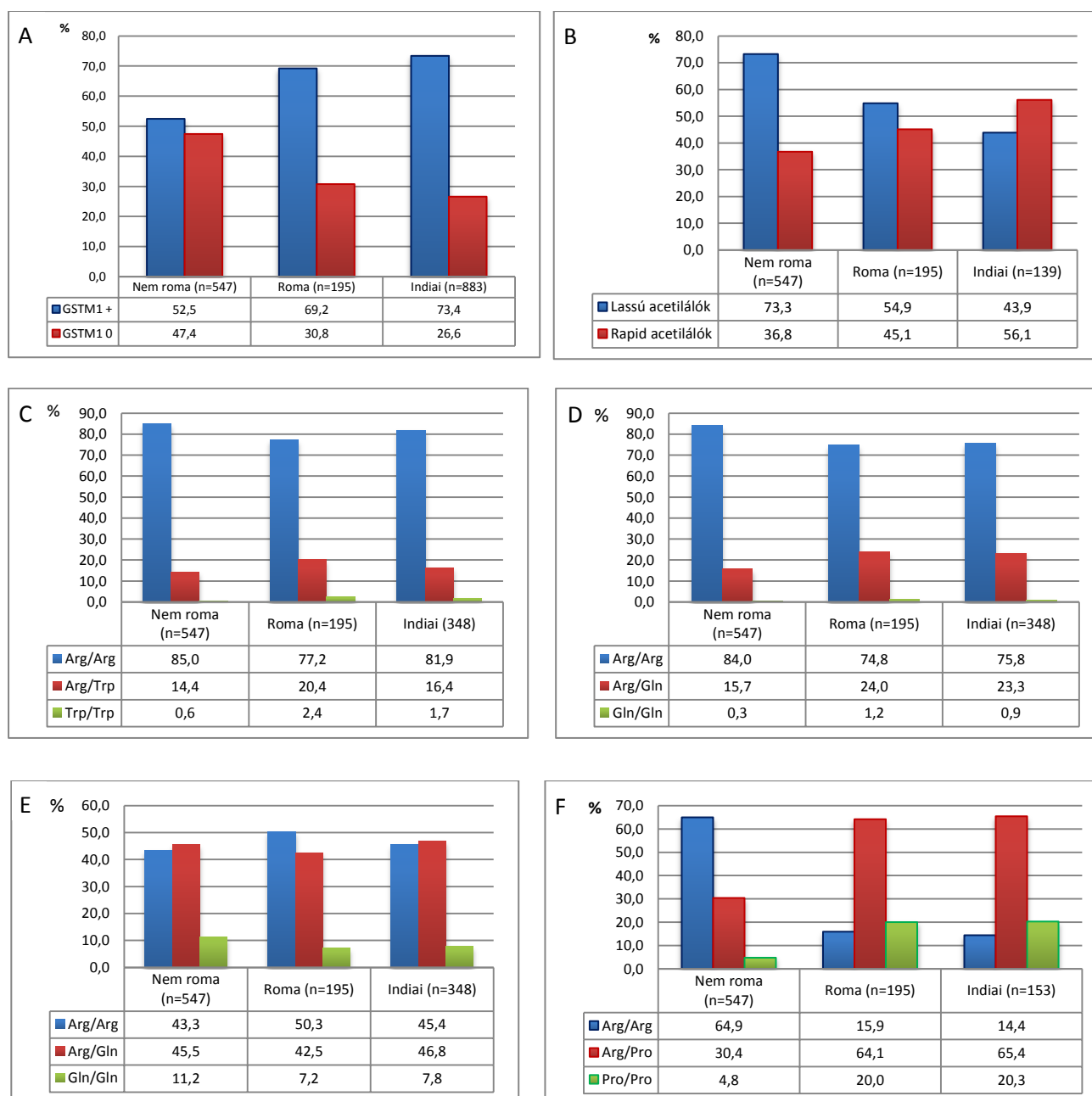
A CYP1A1 allélmegoszlásai és a GSTT1 genotípusok esetében mindhárom populáció hasonló képet mutatott. A GSTM1 0 genotípus prevalenciáját illetően a hazai oláh cigány populáció szignifikánsan különbözött a magyarországi nem roma populációtól (OR: 0,49, 95% CI: 0.34-0.70,  $p < 0,001$ ). A roma népesség ezen gyakoriságok tekintetében az indiai megoszlások képét mutatta és attól statisztikailag szignifikánsan nem tért el. A NAT2 rapid acetilálók arányát illetően a hazai roma populációban talált allélgyakoriság a –jelentős különbséget mutató – hazai nem roma és az indiai népségek között helyezkedett el, de kicsit közelebb az indiai népesség gyakoriságaihoz. A roma genotípus-gyakoriságok statisztikailag szignifikánsan eltértek a nem romákétól (OR: 1,42, 95% CI: 1,00-2,00,  $p = 0,039$ ), míg borderline különbséget találtunk az indiai népségtől (OR: 0,64, 95% CI: 0,41-1,02,  $p = 0,048$ ), (2 A,B. ábra).

### IV.2. Az XRCC1 DNS reparációs enzimre vonatkozó eredmények

Az XRCC1 Arg194Trp polimorfizmus tekintetében a hazai roma/nem roma megoszlások szignifikáns különbséget mutattak, a minor allél (Trp) gyakoribb volt romák között, mint a többségi populációban (OR: 1,75, 95% CI: 1,19-2,57,  $p = 0,003$ ). A hazai nem roma arányok viszont nem mutattak statisztikailag szignifikáns eltérést az indiai megoszlástól, vagyis a hazai roma népesség kis mértékben ugyan, de még az indiainál is „távolabb” állt a hazai nem roma populációtól. Az Arg280Gln polimorfizmusnál a minor allél (Gln) úgyszintén gyakoribb volt romák között, mint nem romákban (20. ábra), az allélgyakoriságok közötti különbség ezúttal is statisztikailag szignifikánsnak bizonyult (OR: 1,68, 95% CI: 1,15-2,46,  $p = 0,003$ ). Az Arg399Gln polimorfizmus esetében a minor allél (Gln) volt ritkább az oláh cigány népességben, és a különbség borderline szignifikanciát mutatott (OR: 0,78, 95% CI: 0,60-1,01,  $p = 0,048$ ) (2 C, D, E ábra).

### IV.3. A TP53 tumorszuppresszor génre vonatkozó eredmények

Az indiai és a hazai nem roma populáció között a TP53 Arg72Pro polimorfizmusa mutatta a legfeltűnőbb különbséget. Míg például az Arg/Arg homozigóták aránya a hazai nem roma populációban 64,9% volt, addig ez Indiában csak 14,4%. A magyarországi roma populációban az indiai populációkban mért allélmegoszlások tükröződtek, a hazai nem roma populációtól jelentősen, statisztikailag szignifikánsan eltérve (OR: 4,36, 95% CI: 3,38-5,63,  $p < 0,001$ ), (22. ábra).



2. ábra: GSTM1, NAT2 genotípusok, az XRCC1 194, 280 és a 399 allélek illetve a TP53 allélek előfordulási gyakorisága magyarországi nem roma, roma, és indiai populációkban. (%)

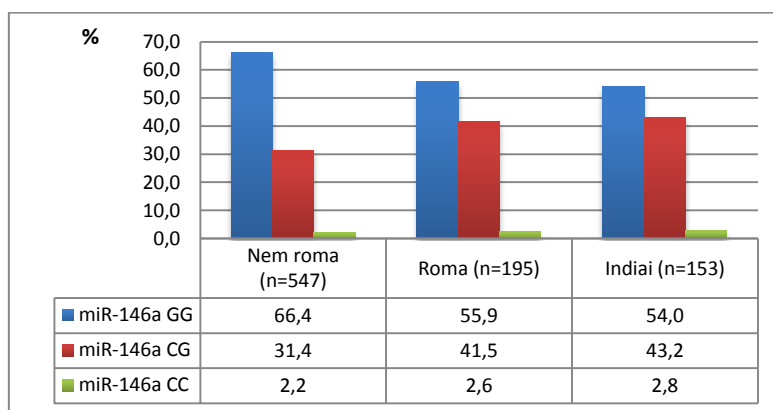
#### IV.4. A pre-miR146a mikroRNS polimorfizmusa és a fej-nyaki laphámrákok közötti kapcsolat

A pre-miR-146a genotípusok megoszlása az alábbi volt (beteg – kontroll): GG 60,7% vs. 69,0%, GC 35,9% vs. 29,1%, és CC 3,4% vs. 1,9%. A vizsgált allélgyakoriságok mindkét csoportban megfeleltek a Hardy-Weinberg egyensúlynak. A többváltozós logisztikus regressziószámítás kapcsolatot mutatott ki a vizsgált pre-miR-146a allélpolimorfizmus és a fej-nyaki laphámrákok

kialakulása között. A GG homozigótákhoz viszonyítva mind a heterozigóták (OR: 1,46, 95% CI: 1,10-1,95,  $p=0,009$ ), mind a CC homozigóták (OR: 2,37, 95% CI: 1,01-5,60,  $p=0,048$ ) aránya statisztikailag szignifikánsan magasabb volt a betegek között, mint a kontroll csoportban. A kapcsolat akkor is szignifikáns volt, ha a heterozigótákat és CC homozigótákat közös csoportba vontuk össze (OR: 1,52, 95% CI: 1,15-2,01,  $p=0,004$ ). Bár jelen vizsgálatunk fő célja nem az alkoholfogyasztás és a fej-nyaki daganatok közötti kapcsolat tanulmányozása volt, elemzésünk szignifikáns, dózisfüggő kapcsolatot talált az alkoholfogyasztás és a fej-nyaki daganatok előfordulása között (erős alkoholfogyasztás: OR: 3,35, 95% CI: 2,18-5,17,  $p<0,001$ ). A krónikus szájüregi betegségek fennállása úgyszintén kockázati tényezőnek bizonyult (OR: 1,87, 95% CI: 1,43-2,45,  $p<0,001$ ), míg az iskolai végzettséggel nem találtunk kapcsolatot. Rétegzett analízist is végeztünk, amelyben a nem hatásmódosító tényezőnek bizonyult: az alkoholfogyasztással (erős alkoholfogyasztás: OR: 4,26 vs. OR: 5,60), a szájüregi rendellenességekkel (OR: 1,75 vs. OR: 2,52) és a pre-miR-146a C alléllal (OR: 1,44 vs. OR: 1,84) egyaránt erősebb volt a kapcsolat nők körében, mint férfiak között. A rétegzett analízisben ugyancsak kölcsönhatást találtunk a pre-miR-146a allélpolimorfizmus és a dohányzás között. A dohányzás, akár a naponta elszívott cigaretták számát, akár a dohányzás időtartamát elemeztük, fokozta a pre-miR-146a C allél kockáztnövelő hatását: ez a hatás csak a hosszabb ideje dohányzóknak vagy a naponta legalább 20 cigarettát szívóknak volt kifejezetten erős és statisztikailag szignifikáns.

#### IV.5. A pre-miR146a mikroRNS-allélmegoszlások a roma népességben

A hazai többségi népesség allélgyakoriságai statisztikailag szignifikánsan különböztek mind az oláh cigány populáció (OR: 1,39, 95% CI: 1,04-1,86,  $p=0,025$ ), mind az indiai népesség megoszlásaitól (OR: 1,48, 95% CI: 1,14-1,93,  $p=0,003$ ). Romák között, illetve az indiai népességben a C allél gyakrabban fordult elő, mint a magyarországi nem roma populációban. A roma megoszlások nem különböznek szignifikánsan az irodalmi adatokból kapott indiai arányoktól (3. ábra).



3. ábra: A miR-146a genotípusok megoszlása hazai nem roma, roma és indiai populációkban (%).

## V. Megbeszélés

A második legfontosabb halálokot képező betegségcsoport Magyarországon a daganatos betegségek csoportja. Jelen PhD munka fő célkitűzése az volt, hogy megpróbáljunk választ adni a kérdésre, vajon a magas hazai roma daganatos halálozások hátterében állhatnak-e (és ha igen, akkor milyen mértékben) genetikai tényezők. Arra törekedtünk, hogy a kiválasztott gének a daganatkialakulás korai lépéseit befolyásoló molekuláris szintű történések minél szélesebb spektrumát reprezentálják. Csak olyan allélpolimorfizmusokat választottunk, amelyekre vonatkozóan korábban már intézetünkben is történtek vizsgálatok valamilyen daganat kockázatára nézve, magyar népességben.

Mivel a miR-146a vonatkozásában hazai adat nem állt rendelkezésre, itt szükségesnek tartottunk egy saját vizsgálatot elvégezni, egyrészt a hazai allélmegoszlások megismerése céljából, másrészt pedig a daganatos kockázatra gyakorolt hatást megítélendő. Ehhez a vizsgálathoz fej-nyaki daganatos betegeket választottunk. A miR-146a rs2910164 polimorfizmusnak a fej-nyaki daganatokkal való kapcsolatát eddig mindössze egyetlen vizsgálat tanulmányozta (Liu, 2010). Ez a vizsgálat nem talált összefüggést az rs2910164 allélpolimorfizmus és a fej-nyaki daganatok kockázata között, de kissé ellentmondásos módon ugyanez a polimorfizmus más genetikai tényezőkkel együtt, azokkal kölcsönhatásban már kockázati tényezőnek bizonyult. Saját vizsgálatunkban arra törekedtünk, hogy Liu és mtsai vizsgálatának esetleges hibalehetőségeit kiküszöböljük, ezért választottuk az illesztett eset-kontroll vizsgálati elrendezést (nem, életkor, dohányzási szokások tekintetében), amivel a potenciális zavaró tényezők hatását megfelelően kiküszöbölhattük (Orsós, 2013). Eltérés mutatkozott továbbá a két vizsgálat között a dohányosok arányát illetően, ami Liu és mtsai vizsgálatánál alacsonyabb volt a fejlett országokban jelenleg meglevő átlagos prevalenciánál. Többek között a fentiek alapján is úgy gondoljuk, hogy saját eredményeink mindenképpen pontosabbak és elfogadhatók a hazai, de az európai népeiségekre is, mint az egyébként az USA-ban végzett másik vizsgálaté.

Az rs2910164 polimorfizmus feltételezhető kockázatomódosító hatása azon alapulhat, hogy befolyásolja az érett miR-146a mennyiségét a sejtben. A miR-146a pedig sokrétű szabályozó funkciói révén befolyásol egyes sejt differenciációs folyamatokat, amiről pedig tudjuk, hogy potenciálisan kapcsolatba hozható a daganatkialakulással (Rusca, 2011). Az egyetlen eddigi vizsgálat, ami a miR-146a expresszióját tanulmányozta szájüregi daganatokban, úgy találta, hogy rosszabb a prognózis fokozott miR-146a-expresszió esetén (Hung, 2012). Ez, bár nem etiológiai, hanem prognosztikus vizsgálat, de annyiban mindenképpen alátámasztja saját eredményeinket, hogy megerősíti a miR-146a és a fej-nyaki daganatok közötti kapcsolat fennállását. Az általunk vizsgált polimorfizmus egy G:U→C:U báziscsere kapcsán párhibához (mismatch) vezet, és csökken az érett mikroRNS mennyisége, amint ezt Jazdzewski és mtsai expressziós vektorral végzett kísérletekkel igazolták (Jazdzewski, 2008). Ezen kívül a miR-146a feltételezett tumor szuppresszor funkcióját alátámasztja továbbá, hogy az említett, humán daganatokban történő expresszióját vizsgáló tanulmányok többsége csökkent expressziót talált. Az esetleges overexpresszió (Hung, 2012; Lavon, 2010) talán a

daganatos transzformáció során megzavart regulációs mechanizmusok hatásának ellensúlyozására, „feed-back” reakcióként alakul ki.

A vizsgálat lényegi részét képezte a roma-nem roma allélmegoszlások összevetése. A vizsgált 9 polimorfizmus közül egyedül a CYP1A1 Ile/Val polimorfizmus nem mutatott eltérést semmilyen összehasonlításban sem, vagyis itt az allélgyakoriságok lényegében megegyeztek mindhárom vizsgált népességben. Ezen kívül még csupán a GSTT1 esetében nem különbözött szignifikánsan a hazai nem roma és roma népesség. Itt statisztikailag szignifikáns különbség volt a magyarországi nem roma és az indiai népesség között, a roma genotípus-gyakoriságok viszont mintegy „középen” helyezkedtek el, és egyiktől sem mutattak szignifikáns eltérést.

A további hét allélpolimorfizmus (TP53, GSTM1, NAT2, pre-miR-146a, XRCC1 194-es kodon, 280-as kodon és 399-es kodon) mindegyikénél statisztikailag szignifikáns különbség volt a hazai roma és nem roma népesség allél- vagy genotípus-gyakoriságai között.

A NAT2 esetében a helyzet hasonló a GSTT1-nél tapasztaltnak, vagyis az indiai és a magyarországi nem roma népesség genotípus-gyakorisága szignifikánsan különbözött egymástól (OR: 2,20, 95% CI: 1,48-3,27,  $p < 0,001$ ), és a roma népesség a kettő között, „félúton” helyezkedett el. A két alappopuláció közötti eltérés egyébként igen jelentős volt: míg a hazai nem roma népességben a rapid acetilálók voltak többségben (73,3%), addig Indiában a lassú acetilálók (56,1%). Ehhez hasonló jelenséget írtak le Sipeky és mtsai az MDR1 gén vizsgálatánál, a C1236T polimorfizmusra vonatkozóan (Sipeky, 2011). A NAT2 polimorfizmus volt tehát az egyetlen, ahol a magyarországi roma népesség szignifikáns különbséget mutatott az indiai populációhoz képest, ami talán azzal magyarázható, hogy ez a gén számos polimorfizmust tartalmaz, a különböző allélek száma több, mint 60, ami az adott régió fokozottabb variabilitására utalhat.

Következőként a TP53 tumor szuppresszor gén polimorfizmusát kell kiemelni, ahol a NAT2-höz hasonlóan igen jelentős különbség volt az allélmegoszlások tekintetében a magyarországi nem roma és az indiai népesség között. Az allélgyakoriságok itt is ellentétes irányt mutatnak a két populációban: míg Magyarországon az Arg allél a gyakoribb, addig Indiában a Pro allél. A roma gyakoriságok szinte teljesen az indiai megoszlással egyeztek meg.

A TP53-hoz hasonlóan a pre-miR146a allélmegoszlások is szignifikánsan különböztek a hazai nem roma és az indiai népességben, a roma megoszlás pedig szintén az indiaihoz volt nagyon hasonló. Ugyanezt a tendenciát láttuk a GSTM1 polimorfizmust illetően is: szignifikáns különbség a hazai nem roma és az indiai népesség között, és a roma megoszlások az indiai arányokhoz voltak közel.

Az XRCC1 gén vizsgált mindhárom polimorfizmusánál statisztikailag szignifikáns különbséget találtunk a hazai roma és nem roma népesség között. Érdekes, hogy mindhárom allélmegoszlásnál sajátos módon a roma arányok még kissé az indiai arányoknál is távolabb álltak a hazai nem roma népességtől. Ez a jelenség sem egyedülálló az irodalomban (Sipeky, 2011).

Annak ellenére tehát, hogy a roma népesség az általunk vizsgált polimorfizmusok majdnem mindegyikének tekintetében különbözött a többségi magyar populációtól, az eredmények azt mutatják, hogy ezek a tényezők nem felelősek a romák magasabb daganatos halálozásaiért. Az eltérő allélmegoszlások ugyanis egymás esetleges kockázatemelő/kockázatcsökkentő hatását ellensúlyozni látszanak (egyes polimorfizmusoknál a high-risk, másoknál pedig a low-risk allélek voltak gyakoribbak romák között). Természetesen a kérdés biztonsággal nem válaszolható meg 7 gén 9 allélpolimorfizmusának elemzése alapján, ezért jelen vizsgálatunk lényegében pilot studynak tekinthető, és remélhetőleg hasonló munkák sora fogja majd követni, számba véve az összes, daganatkialakulás szempontjából fontos genetikai tényezőt. A roma népesség halálozási mutatóinak csökkentése tehát a külső tényezők befolyásolásán keresztül lehetséges, vagyis elsődleges cél a gazdasági-szociális egyenlőtlenségek megszüntetése. Természetesen az egészségmagatartás befolyásolását csak a roma népesség kulturális sajátosságainak megértésével és figyelembe vételével kidolgozott programokkal lehet elérni.

## VI. Új eredmények összefoglalása

- A magyarországi oláh cigány populációban a felsorolt polimorfizmusok tekintetében az alábbi allélmegoszlásokat találtuk:
  - CYP1A1: Ile/Ile 75,9%, Ile/Val: 23,1%, Val/Val: 1,0%
  - GSTM1: + genotípus 69,2%, 0 genotípus 30,8%
  - GSTT1: + genotípus 82,1%, 0 genotípus 18,0%
  - NAT2: lassú acetilálók 54,9% rapid acetilálók 45,1%
  - XRCC1:
    - Arg194Trp: Arg/Arg 77,2%, Arg/Trp 20,4%, Trp/Trp 2,4%
    - Arg280Gln: Arg/Arg 74,8%, Arg/Gln 24,0%, Gln/Gln 1,2%
    - Arg399Gln: Arg/Arg 50,3%, Arg/Gln 42,5%, Gln/Gln 7,2%
  - TP53: Arg/Arg 15,9%, Arg/Pro 64,1%, 20,0%
  - pre-miR-146a rs2910164: G/G 55,9%, G/C 41,5%, C/C 2,6%
- A fenti allélmegoszlások közül 8-nál nem volt statisztikailag szignifikáns különbség az indiai népességből származó adatokkal összehasonlítva. Borderline szintű különbség volt a NAT2 allélmegoszlások tekintetében. Eredményeink alapján tehát a roma populáció megőrizte az ősi genetikai jellemzőit.
- A hazai nem roma többségi populációval összevetve az oláh cigány allélgyakoriságok szignifikánsan eltérőek voltak a GSTM1, NAT2, TP53, XRCC1 Arg194Trp, Arg280Gln és Arg399Gln (borderline), valamint a pre-miR-146a rs2910164 polimorfizmusoknál.
- A fentiektől független eset-kontroll vizsgálatban igazoltuk, hogy a hazai népességben a pre-miR-146a rs2910164 C allél statisztikailag szignifikánsan fokozza a fej-nyaki daganatok kialakulásának kockázatát.

## VII. Irodalom

1. Akkiz H, Bayram S, Bekar A. et al.: Gene. 2011;486(1-2):104-9.
2. Babusik F. Az esélyegyenlőség korlátai Magyarországon. L'Harmattan. 2005.
3. Bennett WP, Hussain SP, Vahakangas KH, et al. J Pathol. 1999;187:8–18.
4. Bogdanović D, Nikić D, Petrović B, et al. Croat Med J. 2007;48(5):720-726.
5. Borlak J, Reamon-Buettner SM. BMC Med Genet. 2006;7:e58.
6. Buch S, Kotekar A, Kawle D. et al.: J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2002;128:627-631.
7. Delphoi Consulting 2004. (<http://www.delphoi.hu/download-pdf/roma-szoc-eu.pdf>)
8. Dumont P, Leu JI, Della PA, et al. Nat. Genet. 2003;33:357–365.
9. Engin AB, Karahalil B, Engin A, Karakaya AE. Mol Biol Rep. 2011;38(8):5379-86.
10. Friedman RC, Farh KK, Burge CB and Bartel DP.: Genome Res. 2009;19: 92-105.
11. Gresham D, Morar B, Underhill PA, et al: Am J Hum Genet. 2001;69(6):1314-31.
12. Hablicsek L. Demográfia. 2007;50(1):5-54.
13. Hamajima N, Saito T, Matsuo K, et al.: Jpn J Cancer Res. 2000; 91: 865–868.
14. Havas G, Kemény I, Kertesi G. Kritika 1998;3:31-33.
15. Hayashi S, Watanbe J, Nakachi K, Kawagiri K. J Biochem. 1991;110:407-411.
16. Hayes JD, Pulford DJ. Crit Rev Biochem Mol Biol. 1995;30:445-600.
17. Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Kavjalainen A, et al. C. Epid. Biom. Prev. 1992;1:485-489.
18. Hishida A, Matsuo K, Goto Y, et al.: Dig Dis Sci. 2011;56:1131–1137.
19. Hung PS, Chang KW, Kao SY, et al. Oral Oncol. 2012;48:404-440.
20. Janky B. Budapest. 1999;217-238.
21. Kalaydjieva L, Gresham D, Calafell F. BMC Med Genet. 2001;2:5.
22. Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, et al.: Carcinogenesis.1993;14:1085-1089.
23. Kemény I, Janky B, Lengyel G. MTA Etnikai-nemzeti Kisebbségkutató Intézet. Budapest. 2004.
24. Ketterer B. Mutat Res. 1988;202(2):343-361.
25. Kogo R, Mimori K, Tanaka F, et al. Clin Cancer Res.2011;17:4277-4284.
26. Kósa K, Lénárt B, Adány R.: Orv Hetil. 2002;143(43):2419-2426.
27. Koupilova I, Epstein H, Holcik J, Hajioff S, McKee M.: Soc Sci Med. 2001;53(9)1191-1204.
28. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, et al.: Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005;14:467-475.
29. Ladányi J, Szelényi I.: Napvilág. 2004;127.
30. Lavon I, Zrihan D, Granit A, et al.: Neuro Oncol.2010;12:422-433.
31. Lee JM, Lee YC, Yang SY, et al.: Int J Cancer. 2001b;95(4):240-6.
32. Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY. RNA. 2008;14:417-424.
33. Liu Z, Li G, Wei S, et al: Cancer. 2010;116(20):4753-4760.
34. Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL, et al: Cancer Res. 1999;59:2557–2561.
35. Majumder M, Sikdar N, Paul RR, Roy B. C. Epid. Biomarkers Prev. 2005;14(9):2106-2112.
36. Matthias C, Bockmuhl U, Jahnke V, et al.: Pharmacogenetics. 1998;8:91–100.
37. Matullo G, Palli D, Peluso M, et al: Carcinogenesis. 2001;22(9):1437-1445.
38. Mittal RD, Gangwar R, George GP, et al: DNA Cell Biol. 2011;30(6):401-6.
39. Murata M, Tagawa M, Kimura M, et al: Carcinogenesis. 1996;17:261-264.
40. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, et al: Pharmacogenetics. 1996;6:1–42.
41. Okkels H, Sigsgaard T, Wolf H, Autrup H. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1997;6:225-231.
42. Orsós Zs, Szanyi I, Csejtej A, Gerlinger I, Ember I, Kiss I. Anticancer Res. 2013;33(1):341-6.
43. Papaconstantinou IG, Lykoudis PM, Gazouli M, et al.: Pancreas. 2012;41:671-677.
44. Permuth-Wey J, Thompson RC, Burton Nabors L: J Neurooncol. 2011;105(3):639-46.

45. Piacentini S, Polimanti R, Porreca F, et al: Mol Biol Rep. 2011;38(2):1225-30.
46. Pool-Zobel BL, Bub A, Liegibel UM, et al: Cancer Epid Biom Prev. 1998;7:891-899.
47. Puporka L, Zádori Z. Roma Sajtóközpont. 1999.
48. ROMEDIA Foundation: <http://romediafoundation.wordpress.com/> 2012/04/08/international-roma-day-when-a-romani-movement-and-anthem-were-born/
49. Rusca N, Monticelli S.: Mol Biol Int. 2011;2011:437301.
50. Seow A, Zhao B, Poh WT, et al: Carcinogenesis. 1999;20:1877-1881.
51. Sipeky C, Csongei V, Jaromi L, et al.: Drug Metab Pharmacokinet. 2011;26(2):206-215.
52. Sjölander A, Birgander R, Kivelä A, Beckman G.: Hum Hered. 1995;45(3):144-9.
53. Starczynowski DT, Morin R, McPherson A, et al.: Blood. 2011;13:595-607.
54. Tandle AT, Sanghvi V, Saranath D.: Br J Cancer.2001;84:739-742.
55. Tomka M. Cigánylét – műhelytanulmányok. MTA Politikai Tudományok Intézete. 1991.
56. Wu K, Su D, Lin K, Luo J, Au WW. Asian Pac J Cancer Prev. 2011;12(9):2237-2243.
57. Wu X, Zhao H, Amos CI, et al: J Natl Cancer Inst. 2002;94:681–90.
58. Xing D, Qi J, Miao X, et al: Int J Cancer. 2002;100:600–605.
59. Zhao B, Lee EJ, Wong JY, et al: Pharmacogenetics. 1995;5:275-280.

## VIII. Saját publikációk

### IX.1. A disszertációhoz kapcsolódó angol nyelvű közlemények

1. **Zs. Orsós**, I. Szanyi, A. Csejtej, I. Gerlinger, I. Ember, I. Kiss: Association of pre-miR-146a rs2910164 polymorphism with the risk of head and neck cancer. Anticancer Res. 2013;33(1):341-6. imp.f.: 1.7
2. **Zs. Orsós**, J. Béres, E. Marek, I. Ember, I. Kiss: Allelic polymorphisms in the Hungarian Roma population. Ethnicity & Health, közlésre elküldve
3. J. Cseh, E. Pázsit, **Zs. Orsós**, E. Marek, A. Huszár, S. Balogh, I. Ember, I. Kiss: Effect of glutathione-S-transferase M1 and T1 allelic polymorphisms on the HPV-induced cervical precancer formation. Anticancer Res. 2011. 31: 3051-3056, 2011. imp f.: 1.656
4. Á Ember, F Budán, G Nowrasteh, T Varjas, I Prantner, Gy Göbel, ÖP Horváth, L Illényi, J Cseh, P Perjési, **Zs Orsós**, P Gergely, K Fehér, I Ember, I Kiss: Application of molecular epidemiological biomarkers by monitoring the effects of treatment in colorectal cancer during follow-up study. European Journal of Oncology. 2011. 16:(2): 99-104.) imp. f.: 0.697
5. A. Csejtej, A. Tibold, Zs. Varga, K. Koltai, A. Ember, **Zs. Orsós**, G. Feher, OP Horvath, I. Ember, I. Kiss: GSTM, GSTT and p53 polymorphisms as modifiers of clinical outcome in colorectal cancer. Anticancer Research. 2008. 28: 1917-1922. imp.f.: 1.39, cit: 14
6. I. Kiss, **Zs. Orsós**, K. Gombos, B. Bogner, A. Csesjtej, A. Tibold, Zs. Varga, E. Pázsit, I. Magda, A. Zólyomi, I. Ember: Association between allelic polymorphism of metabolizing enzymes (CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2E1, mEH) and occurrence of colorectal cancer in Hungary. Anticancer Research. 2007. 27: 2931-2938. imp.f.: 1.414, cit: 12
7. Kiss, Á. Németh, B. Bogner, G. Pajkos, **Zs. Orsós**, J. Sándor, A. Csejtej, Zs. Faluhelyi, I. Rodler and I. Ember: Polymorphisms of glutathione-S-transferase and arylamine N-acetyltransferase enzymes and susceptibility to colorectal cancer. Anticancer Research. 2004. 24: 3965-3970. imp.f.: 1.395, cit: 19



## VIII.2. A disszertációhoz kapcsolódó magyar nyelvű közlemények

8. **Orsós Zs**, Szanyi I, Ember I, Kiss I: A mir 146A RS2910164 G/C allélpolimorfizmus hatása a fejnyaki daganatok kialakulásának kockázatára. Magyar Epidemiológia. 2011. 8:(4) pp. 201-206.
9. Kiss I, Béres J, **Orsós Zs**, Sándor J, Ember I: Daganatok iránti egyéni érzékenységet befolyásoló allélpolimorfizmusok vizsgálata magyarországi roma populációban. Magyar Epidemiológia. 2004. 1: 69-74.

## VIII.3. A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

10. F. Budán, I. Szabó, T. Varjas, G. Nowrasteh, T. Dávid, P. Gergely, Zs. Varga, K. Molnár, B. Kádár, **Zs. Orsós**, I. Kiss, I. Ember: Mixture of Uncaria and Tabebuia extracts are potentially chemopreventive in CBA/Ca mice – A long-term experiment. Phytotherapy Research. 2011. 25:(4): 493-500. imp.f.: 1.878
11. F. Budán, I. Szabó, Á. Ember, ÖP Horváth, L. Illényi, **Zs. Orsós**, A De Blasio, I. Magda, T. Gracza, P. Perjési, T. Dávid, G. Nowrasteh, I. Ember: Effect of Uncaria and Tabebuia extracts on molecular epidemiological biomarkers in patients with colorectal cancer. Acta Alimentaria. 2011. 40:(3): 356-363. imp. f.: 0.379
12. I. Kiss, A. Tibold, R. Halmosi, É. Bartha, K. Koltai, **Zs. Orsós**, L. Bujdosó, I. Ember: Enhancement of organ regeneration in animal models by a stem cell stimulating plant mixture. Journal of Medicinal Food. 2010. 13(3) 599-604.. imp.f.: 1.461
13. K. Gombos, T. Varjas, **Zs. Orsós**, É. Polyák, J. Peredi, Zs. Varga, G. Nowrasteh, A. Tettinger, Gy. Mucsi, I. Ember: The effect of aspartame administration on oncogene and suppressor gene expressions. In Vivo. 2007. 21: 89-92. imp.f.: 1.143
14. **Orsós Zs.**, Nádas E., Dávid T., Ember I., Kiss I.: A CoD tea fogyasztás hatása "short-term" tesztrendszerben onko és tumorszuppresszor gének expressziójára. Egészségtudomány. 2007. 50: 95-107.

## A megjelent és közlésre elfogadott

teljes közlemények összesített impakt faktora: **15,9**

## VIII.4. Könyvfejezetek

1. **Orsós Zs.**: Daganatok epidemiológiája. (XI/3. fejezet) In: Népegészségügyi Orvostan (szerk: Ember István, Kiss István, Cseh Károly). Dialóg Campus , 2013.
2. Kiss I., **Orsós Zs.**: Általános epidemiológia. (X. fejezet) In: Népegészségügyi Orvostan (szerk: Ember István, Kiss István, Cseh Károly). Dialóg Campus, 2013.
3. **Orsós Zs.**, Berényi K., Ember I.: A roma közösségek egészségi állapota. (XVI/6. fejezet) In: Népegészségügyi Orvostan (szerk: Ember István, Kiss István, Cseh Károly). Dialóg Campus , 2013.

4. Kiss I., **Orsós Zs.**, Gombos K., Prantner I., Szele E., Ember I.: Szűrés, szűrővizsgálatok (X/4. fejezet). In: Népegészségügyi Orvostan (szerk: Ember István, Kiss István, Cseh Károly). Dialóg Campus , 2013.
5. **Orsós Zs.**: A külső okból bekövetkezett halálozások epidemiológiája (XI/13. fejezet). In: Népegészségügyi Orvostan (szerk: Ember István, Kiss István, Cseh Károly). Dialóg Campus , 2013.

#### VIII.5. Idézhető angol nyelvű kongresszusi abstractok:

1. **Zs. Orsós**, J. Béres, J. Sándor, I. Ember, I. Kiss: Allelic polymorphisms of metabolizing enzymes in hungarian roma population. Anticancer Research. Vol 24. (5D): 3587.
2. I. Kiss, **Zs. Orsós**, A. Csejtej, R. Schnábel, Zs. Faluhelyi, B. Bogner, J. Sándor, Á. Németh, I. Ember: Allelic polymorphisms of metabolizing enzymes modify the risk of colorectal cancer. Anticancer Research. Vol 24. (5D): 3536.
3. T. Varga, **Zs. Orsós**, Zs. Faluhelyi, A. Csejtej, I. Ember, I. Kiss: Effect of allelic polymorphysm of p53 tumor suppressor gene and vitamin-D receptor gene on individual susceptibility to breast cancer. Anticancer Research. Vol 24. (5D): 3663.
4. Gy. Czakó, M. Varga, **Zs. Orsós**, Cs. Varga, I. Ember, I. Kiss: Effect of plant extract on the expression of oncosuppressor genes in mice. Anticancer Research. Vol 24. (5D): 3462
5. F.T. Molnár, I. Kiss, Zs. Faluhelyi, **Zs. Orsós**, L. Bujdosó: Oncogene and tumor suppressor gene expression in different tissues of lung cancer patients. Hungarian Epidemiology. II. 1: S.58.
6. Gy. Czakó, M. Varga, **Zs. Orsós**, I. Kiss: In vivo gene expression effects of plant extract in mice. Hungarian Epidemiology. II. 1: S.33.
7. **Zs. Orsós**, E. Nádas, T. Dávid, I. Ember, I. Kiss: Effects of CoD extract on onco/tumor suppressor gene expression in mice. International Journal of Molecular Medicine. Vol. 16. (1): S66. 2005.
8. I. Kiss, **Zs. Orsós**, L. Szabó, I. Ember: In vivo effects of a plant extract (Flavin 7) on onco/tumor suppressor gene expression. International Journal of Molecular Medicine. Vol. 16. (1): S66. 2005.
9. **Zs. Orsós**, J. Béres, A. Csejtej, Zs. Faluhelyi, I. Ember, I. Kiss: Allelic polymorphism of the XRCC1 DNA repair gene in the Hungarian Roma (Gipsy) population. International Journal of Molecular Medicine. Vol. 18. (1): 358. 2006.
10. I. Kiss, **Zs. Orsós**, A. Csejtej, Zs. Faluhelyi, Zs. Varga, E. Pázsit, I. Ember: Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes affect the risk of colorectal cancer. International Journal of Molecular Medicine. Vol. 18. (1): 357. 2006.
11. A. Csejtej, A. Tibold, K. Koltai, Zs. Faluhelyi, **Zs. Orsós**, I. Kiss, I. Ember: Allelic polymorphisms as modifiers of colorectal cancer risk. International Journal of Molecular Medicine. Vol. 18. (1): 361. 2006.
12. **Zs. Orsós**, L. Szabó, K. Gombos, I. Ember, I. Kiss: Anticancer Effect of „Flavin 77”, a Plant Extract with High Phytochemical Content: An In Vivo Study with a Transplanted Hypernephroma. Emirates Medical Journal. Vol. 25. (1): 78. 2007.

13. I. Kiss, G. Pajkos, **Zs. Orsós**, K. Gombos, A. Tibold, Zs. Faluhelyi, Zs. Varga and I. Ember: Effect of p53 Allelic Polymorphism on the Prognostic Value of K-ras Point Mutations in Colorectal Cancer. *Emirates Medical Journal*. Vol. 25. (1): 90. 2007.
14. J. Cseh, I. Ember, **Zs. Orsós**, A. Tibold, Zs. Varga, E. Pázsit, I. Kiss: Effect of an allelic polymorphism in the dopamin receptor D2 gene on the risk of cervical cancer. *Anticancer Research* 28:5C, September-October 2008, 3248: A129
15. L. Szabó, I. Kiss, **Zs. Orsós**, I. Ember: Effect of Nano-Fruit-Café on the expression of oncogenes and tumor suppressor genes. *Anticancer Research* 28:5C, September-October 2008, 3274: A186
16. I. Kiss, **Zs. Orsós**, A. Tibold, Zs. Varga, J. Cseh, A. Csejtei, I. Ember: Low penetrance genetic susceptibility factors in human carcinogenesis. *Anticancer Research* 28:5C, September-October 2008, 3351: A345
17. A. Tibold, A. Csejtei, Zs. Varga, K. Koltai, Á. Ember, **Zs. Orsós**, I. Ember, I. Kiss: Allelic Polymorphisms as modifiers of clinical outcome in colorectal cancer. *Anticancer Research* 28:5C, September-October 2008, 3518: A677
18. **Zs. Orsós**, I. Kiss: Allelic polymorphisms and cancer susceptibility. *International Conference of Preventive Medicine and Public Health. Magyar epidemiológia*. VII. 4:
19. I. Szanyi, **Zs. Orsós**, P. Móricz, I. Ember, I. Kiss: Effect of UDP-glucuronyltransferase 1A1 allelic polymorphism on the risk of development and prognosis of head and neck cancers. *International Conference of Preventive Medicine and Public Health. Magyar epidemiológia*. VII. 4:
20. J. Cseh, **Zs. Orsós**, E. Pázsit, Z. Ozsváth, I. Ember, I. Kiss: Allelic polymorphisms as risk/prognostic factors in cervical cancer. *International Conference of Preventive Medicine and Public Health. Magyar epidemiológia*. VII. 4:

## IX. Köszönetnyilvánítás

Szeretném őszintén megköszönni témavezetőmnek Dr. Ember István Professzor Úrnak töretlen támogatását és biztatását munkám és tanulmányaim során, valamint a PhD disszertáció elkészítésénél nyújtott segítségét. Sajnos Professzor Úr már nem lehet velünk, de mindig hálával fogok emlékezni rá.

Szeretném köszönetemet kifejezni munkacsoportom vezetőjének Dr. Kiss István Professzor Úrnak, hogy idejét és fáradságát nem sajnálva pályafutásom során bármikor számíthattam rá.

Szeretném megköszönni családomnak, hogy gyermekkorom óta hittek bennem és szeretetükkel erőt adtak.

Szeretném megköszönni Dr. Béres Judit humángenetikusnak, hogy a roma mintákat a rendelkezésünkre bocsájtotta.

Szeretném megköszönni Déri Tibornénak a laboratóriumban nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsósorban szeretném köszönetemet kifejezni a Magyar Tudományos Akadémiának, hogy a romáknak szánt PhD-ösztöndijával elsőként részesített abban az anyagi és erkölcsi megtiszteltetésben, ami erőt adott PhD-kutatásom és a dolgozatom megírásához is.

# **Carcinogenesis related allelic polymorphisms in the Hungarian Roma population**

**PhD Thesis**

**Zsuzsanna Orsós, MsC**

**Program leader: István Ember MD, DsC**

**Consultant: István Ember MD, DsC**

**University of Pécs**

**Medical School**

**Pécs, 2013**

# I. Introduction

## I.1. The Roma people, main groups, ethnography, demography

The Roma/Gipsy population (approximately 10-12 million people) is the largest European minority (Kalaydieva, 2001). The "Gipsy" word is often used in pejorative sense in several languages, and the first Roma World Congress in London decided to use the "Roma" (Romani) name for the population (<http://romediafoundation.worldpress.com>). The origin of the Roma people is Northern and Southern-Northern India, they arrived to Europe approximately 1000 years ago after a long wandering (Gresham, 2001). Irrespectively from the fact that the Roma minority means one single ethnic group to the majority, it should be noted that the Roma population does not form a homogeneous group. The most pregnant characteristic of the Roma people is their language. Based on this criterion, in Hungary there are three major Roma community. The largest group (70%) is the so called Hungarian Roma ("Romungro" or "musician Gipsy"), they speak only the Hungarian language. Approximately 20% of the Roma belongs to the Vlach Roma ("oláh cigányok", "kolompárok"). Besides the Hungarian they typically speak the "lovári" variant of the Vlach language. The lovári language, as official Roma language is widely and actively used in this ethnic group. A smaller group of the Roma is the Bayash ("beás") Roma, they speak an archaic version of the Roman language. Particularity in the Transdanubian region the new generations of the Bayash Roma do not use the traditional language, which may slowly die out.

At the 2011 census 315,583 persons declared themselves to belong to this ethnic group, this was 3.2% of the total Hungarian population. It is not easy to define who belongs to the Roma minority. Legally those persons can be considered as Roma who declares themselves as Roma, but because of the numerous prejudices concerning these ethnic groups, much less people do that (Ladányi, 2004, Tomka, 1991). Social researchers and sociologists agree that the true number of Roma people is much higher than it is shown by the self-declaration based data of censuses (Kemény, 2004, Puporka, 1999). Based on a series of special estimations, the real number of Roma was approximately 640,000 in 2009 (6-7% of the total population, Háblicsek, 2007). The demographic characteristics of Roma communities significantly differ from those of the majority, their natural demographic indicators (age distribution shifted to the young, high fertility, high mortality, low life expectancy at birth) are similar to populations in the stage of demographic transition (Háblicsek, 2007). In the next period significant increase can be expected in the Roma populations, in all age groups.

## I.2. Health status of the Roma populations

While the Roma groups do not form one single population, all the published results show a uniform and significant difference between the health indicators of the Roma and non Roma people. The life expectancy at birth is with approximately 10-15 years below the average of the majority population (Bogdanović, 2007; Kósa, 2002; Koupilova, 2001). In the industrial countries the major causes of deaths are given by chronic non communicable diseases. In relation to malignant

tumors, according to the study of Delphoi Consulting in 2004, the Roma mortalities were 1.8 times higher than that of the non Roma average (Delphoi Consulting, 2004; Babusik, 2005).

In the etiology of cancers both environmental and genetic factors play an important role. In relation to the Roma population, there is a lack of studies in this field concerning the genetic factors of public health importance. The population attributable risk of genetic factors causing hereditary diseases is relatively low, due to the low occurrence of these factors. If we would like to study the factors with a high impact on incidence and mortality. then we should study the so called “individual susceptibility factors”. These are genetic polymorphisms with minor to moderate effect on the risk of cancer, but occurring with a much higher frequency. Based on the above described assumptions, in the present study we investigated allelic polymorphisms with high population attributable risk on cancer. We tried to model the early carcinogenesis as accurately as possible, by the inclusion of genes in the biotransformation of xenobiotics, DNA repair processes, regulation of the cell proliferation. The selected allelic polymorphisms are proved to have an influence on cancer susceptibility, but, according to our best knowledge, they have not been studied in relation to Roma populations yet. As subjects of our investigation, the Vlach Roma were selected, since this is a relatively large, but closed enough community which strongly keeps its traditions. The following figure illustrates the processes of early carcinogenesis and their key genes, and subsequently the selected genes will be shortly described.

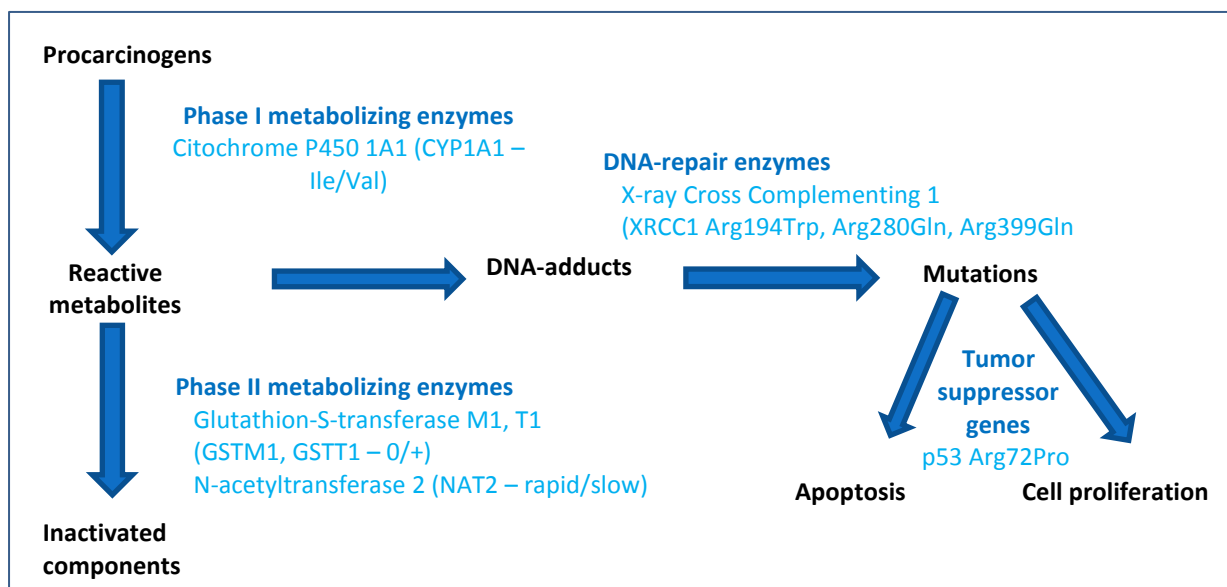


Figure 1.: Early stages of carcinogenesis, with the genes and polymorphisms studied in our investigation

### **I.3. The studied genetic factors**

#### ***I.3.1. Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1 – Ile/Val polymorphism)***

The CYP 1A1 – as a Phase I metabolizing enzyme – often forms more toxic metabolites than that of the original compound (Nelson, 1996). It has several external – potentially carcinogenic – chemical substances (e.g. benzpyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons) and endogenous (e.g. steroid hormones, fatty acids) substrates. The functional Ile/Val polymorphism of the CYP 1A1 gene is caused by an A→G substitution on the area of exon 7, causing an isoleucin→valin change. The protein encoded by the Val allele has a higher enzymatic activity, and thus activates the externally derived, potentially carcinogenic substances faster and more efficiently (Kawajiri, 1993; Hayashi, 1991).

#### ***I.3.2. Glutathione-S-transferase M1 (GSTM1), Glutathione-S-transferase T1 (GSTT1) – Ins/Del polymorphism***

During biotransformation the intracellular level of reactive metabolites of xenobiotic substances and molecules formed during oxidative stress decreases due to the effect of phase II metabolizing enzymes. The most known representatives of these detoxifying processes belong to the glutathione-S-transferase superfamily. The external chemical carcinogenic molecules, e. g. polycyclic aromatic hydrocarbons, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone, dimethylbenzanthracene, methylcolantrene, benzpyrene, and majority of epoxides are detoxified by the mju (GSTM) and theta (GSTT) GST families (Hayes, 2005; Ketterer, 1988). Both the GSTT1 and GSTM1 enzymes a section of the gene may be missing, leading to a truncated protein which is not able to perform the conjugation with glutathione. The so called null genotype indicates the lack of a functional enzymes (both parental alleles encode the truncated enzyme).

#### ***I.3.3. N-acetyltransferase 2 (NAT2) – slow and rapid acetylator polymorphism***

The NAT2 enzyme belong to the family of N-acetyltransferases, and depending on its substrates, it can catalyze both phase I and phase II reactions. The NAT2 takes part in the biotransformation of aromatic amines and hydrazides. Due to NAT2 polymorphisms the transcribed enzymes have different activities (Borlak, 2006). The wild type (NAT2\*4) allele encodes an enzyme with rapid acetylating ability. The several polymorphic alleles can be divided into 3 categories, based on the phenotype (enzymatic activity). Rapid acetylators are homogeneous for the wild type allele, while slow acetylators carry two copies of variant alleles. The third phenotype is the intermediate acetylator, these people have a wild type and a variant allele. There is a simplified categorization with only two categories as well: rapid acetylators carry the wild type allele while slow acetylators do not (Seow, 1999).

#### ***I.3.4. X-ray repair cross complementing 1 (XRCC1) DNA repair gene – Arg194Trp, Arg280His, Arg 399Gln polymorphisms***

The intracellular concentration of carcinogenic substances is determined by the activity or inactivity of our metabolizing enzymes. However, even in spite of an effective detoxification, reactive metabolites can always be found in our cells, which form adducts with macromolecules. Ionizing



radiations, smoking, alcohol, oxidative stress typically lead to single strand breaks of DNA and base defects. These DNA lesions are primarily repaired by base excision repair mechanisms. The XRCC1 gene is a key protein in the BER. Allelic polymorphisms of genes participating in the DNA repair are proved to influence the susceptibility to cancer (Wu, 2011; Engin, 2011).

#### ***1.3.4. TP53 tumor suppressor gene – Arg72Pro polymorphism***

The p53 protein (containing 393 amino acids) takes part in several regulational processes trying to preserve the integrity of the cell. The p53 protein stops the cell cycle in the G1 phase, thus preventing the proliferation of potentially damaged cells. This gives time to the DNA repair enzymes to correct the DNA damage. If the DNA damage cannot be repaired, the p53 protein induces apoptosis, and thus protects the whole organism. Mutations of the TP53 gene have been described in approximately 50% of the human tumors (Bennett, 1999). The gene, however, possesses allelic polymorphisms as well, with the codon 72 Arg/Pro polymorphism being the most important one. This is caused by a G→C substitution leading to an arginine-proline change. This amino acid replacement is on the transactivational domain of the protein; the apoptotic and transcriptional activity of the protein differs from that of the wild type allele (Dumont, 2003). The Arg/Pro allelic frequencies show a wide distribution in different races/ethnic groups, and are also responsible for the individual/interethnic differences in cancer susceptibility (Wu, 2002).

#### ***1.3.6. MicroRNAs – miR-146a (miR-146a) polymorphism***

The majority of the human genome is under microRNA regulation (Friedman, 2009), including cancer susceptibility genes. Similarly to the functional genes, the microRNA-coding sequences may also possess polymorphisms which may affect the process of maturation or the function of the mature microRNA. These allelic polymorphisms can affect the maturation and/or stability of the microRNA, even if they are on areas which are cleaved during microRNA processing. Among the targets of miR-146a there are several genes which play an important role in the human carcinogenesis, so through the regulation of these genes the miR-146a can also have an influence on the risk of human cancers. In the mentioned own pilot study we analyzed the effect of miR-146a rs 2910164 polymorphism on the risk of head and neck cancer in a case-control study.

### **1.4. Head and neck cancer**

Among the European countries Hungary had the highest mortality of head and neck cancer in 2012. The strongest known risk factors of head and neck tumors are smoking and consumption of alcoholic beverages. Their effect is significant separately, but in case of their simultaneous presence the risk of lip and mouth cancers is multiplied. Bad or inadequate oral hygiene is also a prominent risk factor. The role of high-risk HPV types (e.g. 16, 18) in the etiology of squamous head and neck cancers is also well known (Kreimer, 2005). Among people in low socioeconomic classes the incidence of head and neck cancers is much higher than in higher socioeconomic groups, since these risk factors have much higher prevalence among the poor. Because of the high Hungarian head and neck cancer mortality and the significantly elevated risk of the Roma population a separate study was included (independently from the main train of thought of the PhD work) to describe the effect of pre-miR-146a allelic polymorphism on the risk of head and neck tumors. This

study was not performed on an ethnic bases, the subjects was a group from the “general Hungarian population”. The advantage of this strategy is to supply results applicable to the total Hungarian population.

## II. Objectives

- Description of the allelic distributions of certain genes encoding metabolizing enzymes (CYP1A1, GSTM1, GSTT1, NAT2) in the Hungarian Vlach Roma population.
- Description of the allelic frequencies of XRCC1, a key DNA repair enzyme, in the Hungarian Vlach Roma population.
- Description of the allelic frequencies of TP53 tumor suppressor gene, in the Hungarian Vlach Roma population.
- Studying and describing the effect of pre-miR-146a rs2910164 allelic polymorphism on the risk of head and neck cancer.
- Description of the allelic frequencies of pre-miR-146a rs2910164, in the Hungarian Vlach Roma population.
- Description of the above allelic polymorphisms in a Hungarian, non Roma population, comparison between Roma and non Roma allelic frequencies. Based on the Indian origin of the Roma, comparison with Indian allelic distributions, taken from the literature.

## III. Materials and methods

### III.1. Participants, study design

#### ***III.1.1. Comparison between Roma and non Roma allelic distributions***

In the present PhD work 195 Vlach Roma persons have been genotypes. The Roma participants were identified, selected, contacted in the framework of a Roma project of the Johan Béla National Center for Epidemiology, including the collection of blood samples. The samples were kindly provided to us by dr. Judit Béres. The sampling and the examinations were carried out in the possession of the necessary ethical permissions and informed consent of the participants; the participation was voluntary. Five hundred forty seven Hungarian non Roma persons served as controls (peripheral blood was taken from them, and the allelic distributions were compared with those of the Roma participants). These allelic frequencies were also compared with distributions

from the Indian literature, based on the Indian origin of the Roma (Mittal, 2011; Majumder, 2005; Buch, 2002; Tandle, 2001; Zhao, 1995). Within our limitations, we tried to use Northern Indian populations for these comparisons.

### ***III.1.2. Association between the risk of head and neck tumors and the pre-miR-146a rs 2910164 polymorphism***

This case control study was performed independently from the Roma/non Roma comparisons, its goal was to describe the effect of pre-miR-146a rs2910164 allelic polymorphism on the risk of head and neck cancer in the Hungarian population. The ethnic identity of the participants was unknown (not asked/registered), such selection was not applied. Both the case and control groups consisted of 468 participants. Members of the control group were individually adjusted to the patients, based on age ( $\pm 5$  years), gender and smoking habits.

## **III.2. Genotyping**

The peripheral blood was repeatedly centrifuged by 0,84% ammonium-chloride solution to remove red blood cells, and DNA was isolated (GenomicPrep, Pharmacia, Uppsala, Sweden, according the manufacturer's instructions) from the remaining white blood cells. The genotyping methods were as follows:

### ***III.2.1. CYP1A1 Ile/Val polymorphism***

The genotype for exon 7 Ile/Val polymorphism can be determined by an allele specific polymerase chain reaction (PCR) (Hirvonen, 1992). The reaction is performed in parallel, in two tubes, with the same upstream primer, but with different downstream primers. The sequence of the upstream primer was GAAAGGCTGGGTCCACCCTCT, and the downstream primers were AAGACCTCCCAGCGGGCAAT and AAGACCTCCCAGCGGGCAAC. The amplification occurred in the tube with the fully complementary downstream primer.

### ***III.2.2. GSTM1 – GSTT1 simultaneous genotyping***

The reaction mix contained GSTM1 and GSTT1 primers, and additionally (for control purposes) primers for a segment of the  $\beta$ -globin gene (Pool-Zobel, 1998). GSTM1-F: GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC, GSTM1-R: GTTGGGCTCAAATATACGGTGG, GSTT1-F: TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC, GSTT1-R: TCACCGGATCATGGCCAGCA,  $\beta$ -globin-F: CAACTTCATCCACGTTCCACC,  $\beta$ -globin-R: GAAGAGCCAAGGACAGGTAC. In case of the + genotype an amplification occurred, while there was no amplification at the 0 genotype.

### ***III.2.3. NAT2 rapid/slow acetylator polymorphism***

The products after PCR amplification were divided into 3 parts and digested with 3 different restriction endonucleases (KpnI, TaqI, and BamHI), in order to identify the most frequent slow acetylator genotypes. In 95% of the cases these alleles /M1 (KpnI), M2 (TaqI), M3 (BamHI)/ are responsible for the slow NAT2 acetylating phenotype. The participant was considered as slow acetylator if the wild type allele was not present, so both alleles were variant alleles (Okkels, 1997). Primers: GGAACAAATTGCACTTGG, TCTAGCATGAATCACTCTGC.

### **III.2.4. XRCC1 – DNA repair enzyme polymorphisms**

The variants of the XRCC1 enzyme were studied with restriction fragment length polymorphism (Xing, 2002; Lee, 2001; Lunn, 1999). Codon 194 primers: 5'-GCC AGG GCC CCT CCT TCA A -3', 3'-TAC CCT CAG ACC CAC GAG T -5', digestion: PvuII, codon 280 primers: 5'-TTG ACC CCC AGT GGT GCT AA -3', 3'-GGC TGG GAC CAC CTG TGT T -5', digestion: RsaI, codon 399 primers: 5'- TTG TGC TTT CTC TGT GTC CA -3', 3'- TCC TCC AGC CTT TTC TGA TA -5', digestion: MspI.

### **III.2.5. TP53 Arg/Pro polymorphism**

The allele specific amplification was performed parallel in two tubes, with the same 3' primer, but with primers differing in their last 5' base (Murata, 1996). 3' primer: GCAACTGACCGTGCAAGTCA, 5' primers: ATGCCAGAGGCTGCTCCCCG, ATGCCAGAGGCTGCTCCCCC.

### **III.2.6. Pre-miR-146a rs2910164 polymorphism**

The miR-146a genotyping was performed with the method of the so called confronting primer pairs (Hishida, 2011; Hamajima, 2000). The two primer pairs were designed so that in case of pair 1 the last base of the reverse primer, while at pair 2 the forward primer fell to the SNP site. The first primer was fully complementary with one, the second primer with the other allele, and thus the following results are achieved: A 261 bp fragment is produced always (1. pair forward and 2. pair reverse primers), carriers of the C allele will give an additional 128 bp fragment (1. primer pair), and the G allele will generate a 182 bp fragment (2. primer pair). Primers: F1: AAGCAGCTGCATTGGATT, R1: CAGCTGAAGAACTGAATTCAC, F2: GTTGTGTCAGTGTGACACCTC, and R2: CAAGCTCTTCAGCAGACTGA.

## **III.3. Statistical methods**

Comparison of the allelic frequencies was made by computing odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI), along with p-values of the Pearson's chi-square test. Fitting to the Hardy-Weinberg equilibrium was tested with chi-square test. In the case-control study the age was compared with Student's t-test, while for the frequency based variables chi-square test was used. Connection between risk factors and head and neck cancer was analyzed by logistic regression analysis, adjusted according age, educational status and presence of chronic oral disorders. IBM SPSS v19 software was used for the statistical analysis.

## **IV. Results**

The allelic distributions of the Hungarian non Roma participants were compared to the results of similar studies on other European or American populations, and our results fitted to the line of those studies (Piacentini, 2011; Borlak, 2006; Matullo, 2001; Matthias, 1998; Sjölander, 1995). Concerning the pre-miR-146a polymorphism, our own results somewhat differed from those of a US study, but showed no statistically significant difference from the results of a Turkish publication (Permuth-Wey, 2011; Akkiz, 2011). All of the studied allelic distributions fitted to the Hardy-Weinberg equilibrium.

## IV.1. Metabolizing enzymes

The allelic distributions of CYP1A1 and the GSTT1 genotypes were similar for all the three studied populations. Concerning the prevalence of GSTM1 0 genotype, there was a statistically significant difference between the Hungarian Roma and non Roma population (OR: 0,49, 95% CI: 0.34-0.70,  $p<0,001$ ), (Figure 2A). The Roma population showed a distribution similar to the Indian one, without a statistically significant difference. With respect to the frequency of NAT2 rapid acetylators, the Hungarian Roma population was between the Hungarian non Roma and the Indian distributions – the latter two differed significantly from each other – but it was a little closer to the Indian one (Figure 2B). The Roma genotype-frequencies (XXXittamagyarbanelütéstjavítani) differed statistically significantly from those of the non Roma (OR: 1,42, 95% CI: 1,00-2,00,  $p=0,039$ ), while there was a borderline significant difference from the Indian distribution (OR: 0,64, 95% CI: 0,41-1,02,  $p=0,048$ ).

## IV.2. XRCC1 DNA repair enzyme

The Hungarian Roma and non Roma distributions showed a significant difference for the Arg194Trp polymorphism, the minor (Trp) allele was more frequent among Roma than in the majority population (OR: 1,75, 95% CI:1,19-2,57,  $p=0,003$ ). The Hungarian non Roma distributions, however, did not differ statistically significantly from those of the Indian population, which means that the Hungarian Roma population showed a somewhat longer distance from the Hungarian non Roma than the Indian population did. At the Arg280Gln polymorphism the minor allele (Gln) was also more frequent among Roma than in the non Roma participants the difference proved to be statistically significant (OR: 1,68, 95% CI:1,15-2,46,  $p=0,003$ ). In case of the Arg399Gln polymorphism the minor allele (Gln) was less frequent in the Vlach Roma population, with a borderline significance (OR: 0,78, 95% CI:0,60-1,01,  $p=0,048$ ), (Figure 2 C,D,E).

## IV.3. TP53 tumor suppressor gene

The largest difference between the Indian and Hungarian non Roma populations was found here: While the proportion of Arg/Arg homozygous participants was 64,9% in the Hungarian sample, in India this was only 14.4%. The Hungarian Roma minority displayed more or less the Indian distributions, with a strong and statistically difference from the Hungarian non Roma population (OR: 4,36, 95% CI: 3,38-5,63,  $p<0,001$ ) (Figure 2F).

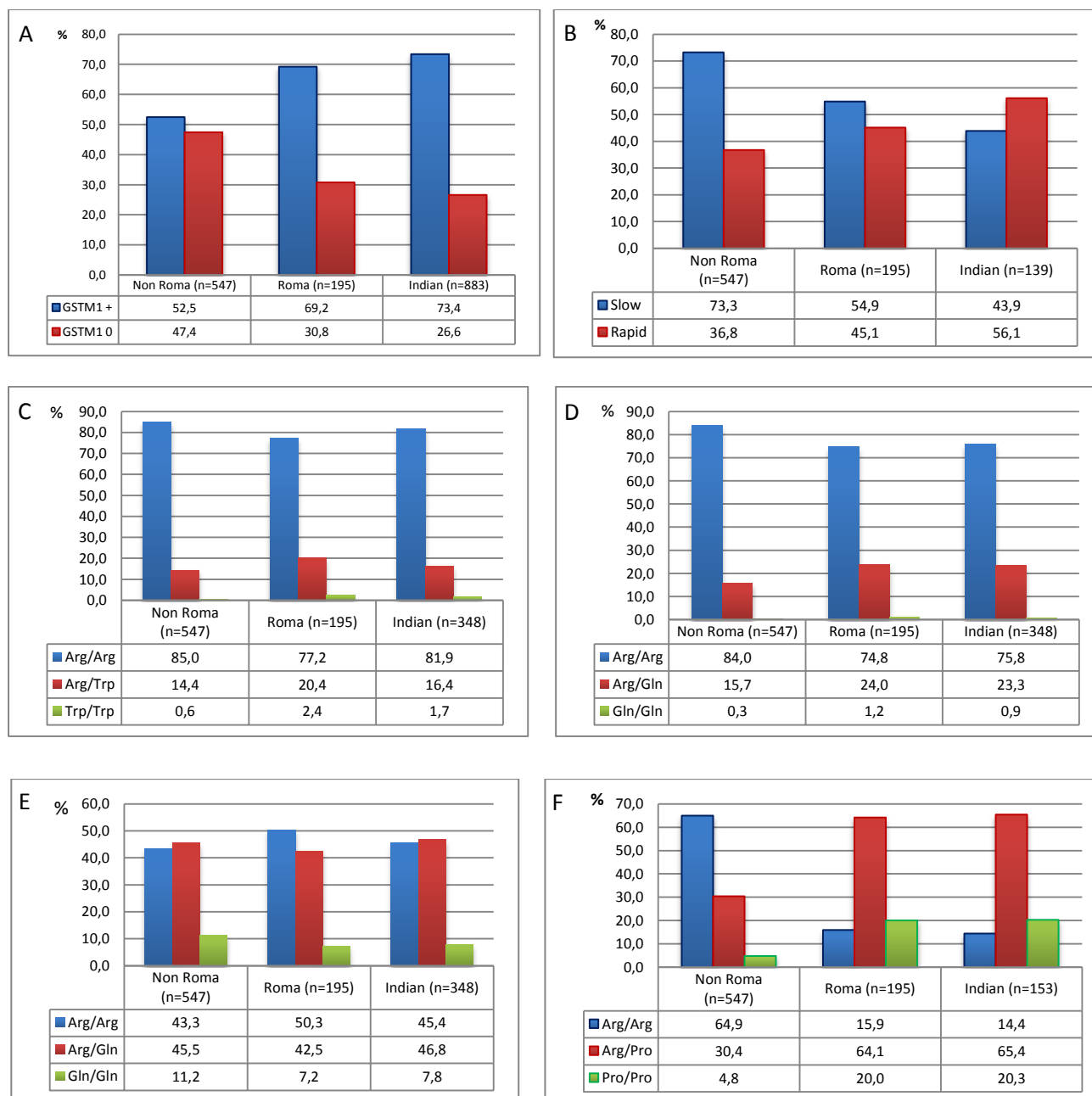


Figure 2.: Occurrence of GSTM1, NAT2 genotypes, XRCC1 codon 194, 280 and 399 alleles and TP53 codon 72 alleles in the Hungarian Roma, non Roma and Indian populations (%).

#### IV.4. Association between pre-miR-146a polymorphism and head and neck cancers

The following distribution was found for the pre-miR-146a rs2910164 genotypes (case – control): GG 60.7% vs. 69.0%, GC 35.9% vs. 29.1%, CC 3.4% vs. 1.9%. The studied distributions in both groups fitted to the Hardy-Weinberg equilibrium. The multiple logistic regression analysis showed an association between pre-miR-146a polymorphism and the formation of head and neck cancers.

Compared to the GG homozygotes proportion of both the heterozygotes (OR: 1,46, 95% CI: 1,10-1,95,  $p=0,009$ ) and CC homozygotes (OR: 2,37, 95% CI: 1,01-5,60,  $p=0,048$ ) was higher among cases than in controls. The connection was also statistically significant when heterozygotes and CC homozygotes were handled together as one single group (OR: 1,52, 95% CI: 1,15-2,01,  $p=0,004$ ). Although it was not the main goal of our study to analyze the association between alcohol consumption and head and neck cancer, we found a statistically significant, dose dependent connection between these two factors (OR: 3,35, 95% CI: 2,18-5,17,  $p<0,001$ ). Occurrence of chronic oral conditions proved also to be a statistically significant risk factor (OR: 1,87, 95% CI: 1,43-2,45,  $p<0,001$ ), while no connection was found with the level of education. In our stratified analysis gender proved to be an effect modifier: Alcohol consumption (high intake: OR: 4,26 vs. OR: 5,60), oral disorders (OR: 1,75 vs. OR: 2,52) and presence of pre-miR-146a C allele (OR: 1,44 vs. OR: 1,84) showed a stronger connection with cancer risk in females than in males. The stratified analysis also found an interaction between the pre-miR-146a polymorphism and smoking habits. Smoking increased the risk-increasing effect of the pre-miR-146a C allele, either in relation to the number of cigarettes smoked or to the duration of smoking: This risk-increasing effect was strong or statistically significant in participants smoking at least 20 cigarettes per day or in long-time smokers.

#### IV.5. Pre-miR146a allelic distributions in the Roma population

The allelic distribution in Hungarian majority differed statistically significantly from both the Roma (OR: 1,39, 95% CI: 1,04-1,86,  $p=0,025$ ) and the Indian (OR: 1,48, 95% CI: 1,14-1,93,  $p=0,003$ ) distributions. The C allele occurred more frequently in Roma and Indians than in the Hungarian non Roma population. The Roma and Indian frequencies did not differ from each other significantly (Figure 3).

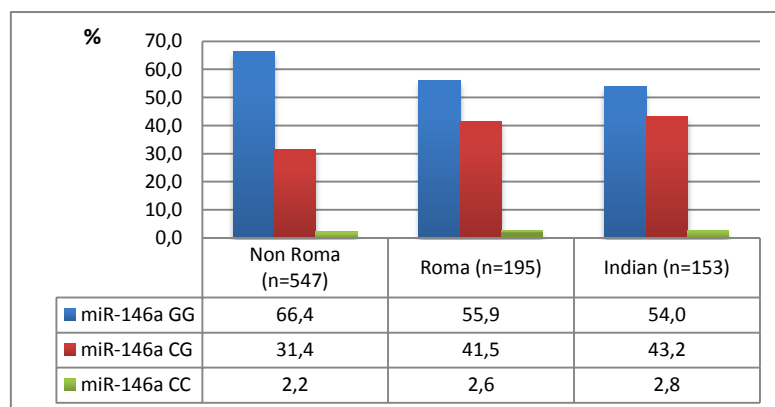


Figure 3: Distribution of miR-146a genotypes in the Hungarian Roma, non Roma and Indian populations (%).

## V. Discussion

Cancer is the second leading cause of deaths in Hungary. The main goal of the present PhD work was to address the question of whether genetic factors can be found in the background of the high Hungarian Roma cancer mortalities (and if yes, then to assess the extent of their contribution). We tried to cover the broadest possible steps of the early carcinogenic processes. All the selected allelic polymorphisms have been already studied in our Department in relation to the risk of tumors in the Hungarian population.

Due to the lack of Hungarian miR-146a data, we planned an own study to describe the Hungarian allelic frequencies, and, on the other side, to assess the effect of this polymorphism on the risk of head and neck cancer. The effect of miR-146a rs2910164 polymorphism on the risk of head and neck cancer has been studied in one single study yet (Liu, 2010). This study did not find an association between this polymorphism and the risk of head and neck tumors, but somewhat controversially, the same polymorphism seemed to have an influence on this risk in an interaction with other polymorphisms. In our study we tried to eliminate the possible sources of error in the study of Liu et al. This is why we chose the matched case-control design (according to gender, age, smoking habits), which could eliminate the effects of possible important confounders (Orsós, 2013). There was a difference between the proportions of smokers as well, in the study of Liu it was lower than the usually reported proportions in developed countries. Based on the above considerations we believe that our results are more accurate and applicable to the Hungarian population than those of the US study.

The possible risk modifying effect of the rs2910164 polymorphism may be based on the fact that it modifies the amount of the mature miR-146a in the cell. The miR-146 has an influence on several cell differentiation processes, thus it is potentially connected to the cancer formation (Rusca, 2011). The only study in relation to miR-146a expression in oral cancer found that an increased miR-146a expression is associated with a worse prognosis (Hung, 2012). While this is not an etiological, but a prognostic study, to a certain extent it still supports our results by confirming the connection between miR-146a and head and neck cancers. Due to a G:U→C:U base change the rs2910164 polymorphism leads to a base mismatch and reduced amount of the mature miRNA, as it was demonstrated by Jazdzewski with the help of expression vectors (Jazdzewski, 2008). The supposed tumor suppressor function of the miR-146a is further supported by the fact that the majority of related studies found its lower expression in human tumors than in healthy tissues. The rarely found overexpression (Hung, 2012; Lavon, 2012) could be explained by a possible feedback mechanism, as a reaction to the disturbed regulatory mechanisms.

The essential part of our study was the comparison between Roma and non Roma allelic distributions. From the 9 studied polymorphisms only the CYP1A1 did not show a difference in this respect, the allelic distributions were similar in the studied populations. Except from that, no difference was found between the Hungarian Roma and non Roma populations for the GSTT1 polymorphism. Here, however, there was a statistically significant difference between the Hungarian non Roma and the Indian populations, and the Roma distributions were approximately “halfway” between them (showing no significant distance from either population).

There was a statistically significant difference between the allelic distributions of the Hungarian Roma and non Roma populations at the other 7 studied allelic polymorphisms (TP53, GSTM1, NAT2, pre-miR-146a, XRCC1 codon 194, 280, 399).



In case of NAT2 the situation was similar to that of the GSTT1, the Roma population was halfway between the non Roma and Indian populations (the latter two showed a statistically significant difference) (OR: 2.20, 95% CI: 1.48-3.27,  $p < 0.001$ ). The distance between the two “base populations” was very large, while the Hungarian non Roma populations consisted of 73.3% rapid acetylators, this genotype was found in only 56.1% of the Indians. A similar phenomenon was published by Sipeky for the C1326T polymorphism of the MDR1 gene (Sipeky, 2011). This polymorphism was the only one with a statistically significant difference between the Roma and Indian populations, which might be explained by the high number – above 60 - of allelic variants of the NAT2 gene (indicating a stronger variability of this region).

The allelic distributions of the TP53 tumor suppressor gene, similarly to the NAT2, displayed a significant difference between Hungarian Roma and Indian populations. The allelic frequencies show an opposite tendency in these two populations as well: in Hungary the predominant allele was the Arg allele, while in India the Pro allele. The Roma frequencies were very similar to the Indian distribution.

The pre-miR-146a distributions also showed a significant difference between non Roma and Indians, and the Roma distribution was also similar to the Indian one. The same tendency was seen at the GSTM1 polymorphism as well.

All the three XRCC1 polymorphisms showed the “usual” difference between the two base populations. Interestingly the Roma distributions were more distant from the Hungarian non Roma than the Indian distribution itself. This is, however, not a unique phenomenon in the literature (Sipeky, 2011).

In spite of the existing statistically significant differences for almost all the studied allelic distributions, our results indicate that these genetic factors are not responsible for the high cancer mortality in the Hungarian Roma population. Namely, the allelic distributions seem to balance the risk increasing / risk decreasing effects of each other (at certain polymorphisms the high-risk alleles are more frequent among Roma, while at other polymorphisms the low-risk alleles). Naturally, this complex question cannot be answered by studying only 9 polymorphisms of 7 genes, so our present study can be considered as a pilot study, which will hopefully be followed by numerous such investigations, covering the broadest possible range of genetic factors. Improvement of the Roma health indicators and reduction in their mortality can be reached by exerting an influence on the external factors, so the primary goal is to eliminate the socioeconomic inequalities. However, an influence on the health behavior can only be reached by programs which are based on the understanding and accepting the cultural and traditional characteristics of the Roma population.

## **VI. Summary of the new findings**

- The following allelic distributions have been found in the Hungarian Vlach Roma population:
  - CYP1A1: Ile/Ile 75.9%, Ile/Val: 23.1%, Val/Val: 1.0%
  - GSTM1: + genotype 69.2%, 0 genotype 30.8%
  - GSTT1: + genotype 82.1%, 0 genotype 18.0%
  - NAT2: slow acetylators 54.9% rapid acetylators 45.1%

- XRCC1:
  - Arg194Trp: Arg/Arg 77,2%, Arg/Trp 20.4%, Trp/Trp 2.4%
  - Arg280Gln: Arg/Arg 74.8%, Arg/Gln 24.0%, Gln/Gln 1.2%
  - Arg399Gln: Arg/Arg 50.3%, Arg/Gln 42.5%, Gln/Gln 7.2%
- TP53: Arg/Arg 15.9%, Arg/Pro 64.1%, 20.0%
- pre-miR-146a rs2910164: G/G 55.9%, G/C 41.5%, C/C 2.6%
- Eight of the above allelic distributions did not exhibit a statistically significant difference from the Indian allelic frequencies. Our results suggest that the Roma population conserved its ancient genetic characteristics.
- There was a statistically significant difference between the Hungarian Roma and non Roma populations with respect to GSTM1, NAT2, TP53, XRCC1 Arg194Trp, Arg280Gln, Arg399Gln (borderline) and pre-miR-146a rs2910164 polymorphisms.
- In a separate study we demonstrated that the pre-miR-146a rs2910164 C allele statistically significantly increased the risk of head and neck cancer in the Hungarian population.

## VII. References

1. Akkiz H, Bayram S, Bekar A. et al.: Gene. 2011;486(1-2):104-9.
2. Babusik F. Az esélyegyenlőség korlátai Magyarországon. L'Harmattan. 2005.
3. Bennett WP, Hussain SP, Vahakangas KH, et al. J Pathol. 1999;187:8–18.
4. Bogdanović D, Nikić D, Petrović B, et al. Croat Med J. 2007;48(5):720-726.
5. Borlak J, Reamon-Buettner SM. BMC Med Genet. 2006;7:e58.
6. Buch S, Kotekar A, Kawle D. et al.: J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2002;128:627-631.
7. Delphoi Consulting 2004. (<http://www.delphoi.hu/download-pdf/roma-szoc-eu.pdf>)
8. Dumont P, Leu JI, Della PA, et al. Nat. Genet. 2003;33:357–365.
9. Engin AB, Karahalil B, Engin A, Karakaya AE. Mol Biol Rep. 2011;38(8):5379-86.
10. Friedman RC, Farh KK, Burge CB and Bartel DP.: Genome Res. 2009;19: 92-105.
11. Gresham D, Morar B, Underhill PA, et al: Am J Hum Genet. 2001;69(6):1314-31.
12. Hablicsek L. Demográfia. 2007;50(1):5-54.
13. Hamajima N, Saito T, Matsuo K, et al.: Jpn J Cancer Res. 2000; 91: 865–868.
14. Havas G, Kemény I, Kertesi G. Kritika 1998;3:31-33.
15. Hayashi S, Watanbe J, Nakachi K, Kawagiri K. J Biochem. 1991;110:407-411.
16. Hayes JD, Pulford DJ. Crit Rev Biochem Mol Biol. 1995;30:445-600.
17. Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Kavjalainen A, et al. C. Epid. Biom. Prev. 1992;1:485-489.
18. Hishida A, Matsuo K, Goto Y, et al.: Dig Dis Sci. 2011;56:1131–1137.
19. Hung PS, Chang KW, Kao SY, et al. Oral Oncol. 2012;48:404-440.
20. Janky B. Budapest. 1999;217-238.
21. Kalaydjieva L, Gresham D, Calafell F. BMC Med Genet. 2001;2:5.
22. Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, et al.: Carcinogenesis.1993;14:1085-1089.
23. Kemény I, Janky B, Lengyel G. MTA Etnikai-nemzeti Kisebbségkutató Intézet. Budapest. 2004.
24. Ketterer B. Mutat Res. 1988;202(2):343-361.
25. Kogo R, Mimori K, Tanaka F, et al. Clin Cancer Res.2011;17:4277-4284.
26. Kósa K, Lénárt B, Adány R.: Orv Hetil. 2002;143(43):2419-2426.

27. Koupilova I, Epstein H, Holcik J, Hajioff S, McKee M.: Soc Sci Med. 2001;53(9):1191-1204.
28. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, et al.: Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005;14:467-475.
29. Ladányi J, Szelényi I.: Napvilág. 2004;127.
30. Lavon I, Zrihan D, Granit A, et al.: Neuro Oncol. 2010;12:422-433.
31. Lee JM, Lee YC, Yang SY, et al.: Int J Cancer. 2001b;95(4):240-6.
32. Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY. RNA. 2008;14:417-424.
33. Liu Z, Li G, Wei S, et al: Cancer. 2010;116(20):4753-4760.
34. Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL, et al: Cancer Res. 1999;59:2557–2561.
35. Majumder M, Sikdar N, Paul RR, Roy B. C. Epid. Biomarkers Prev. 2005;14(9):2106-2112.
36. Matthias C, Bockmuhl U, Jahnke V, et al.: Pharmacogenetics. 1998;8:91–100.
37. Matullo G, Palli D, Peluso M, et al: Carcinogenesis. 2001;22(9):1437-1445.
38. Mittal RD, Gangwar R, George GP, et al: DNA Cell Biol. 2011;30(6):401-6.
39. Murata M, Tagawa M, Kimura M, et al: Carcinogenesis. 1996;17:261-264.
40. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, et al: Pharmacogenetics. 1996;6:1–42.
41. Okkels H, Sigsgaard T, Wolf H, Autrup H. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1997;6:225-231.
42. Orsós Zs, Szanyi I, Csejtej A, Gerlinger I, Ember I, Kiss I. Anticancer Res. 2013;33(1):341-6.
43. Papaconstantinou IG, Lykoudis PM, Gazouli M, et al.: Pancreas. 2012;41:671-677.
44. Permuth-Wey J, Thompson RC, Burton Nabors L: J Neurooncol. 2011;105(3):639-46.
45. Piacentini S, Polimanti R, Porreca F, et al: Mol Biol Rep. 2011;38(2):1225-30.
46. Pool-Zobel BL, Bub A, Liegibel UM, et al: Cancer Epid Biom Prev. 1998;7:891-899.
47. Puporka L, Zádori Z. Roma Sajtóközpont. 1999.
48. ROMEDIA Foundation: <http://romediafoundation.wordpress.com/> 2012/04/08/international-roma-day-when-a-romani-movement-and-anthem-were-born/
49. Rusca N, Monticelli S.: Mol Biol Int. 2011;2011:437301.
50. Seow A, Zhao B, Poh WT, et al: Carcinogenesis. 1999;20:1877-1881.
51. Sipeky C, Csengei V, Jaromi L, et al.: Drug Metab Pharmacokinet. 2011;26(2):206-215.
52. Sjölander A, Birgander R, Kivelä A, Beckman G.: Hum Hered. 1995;45(3):144-9.
53. Starczynowski DT, Morin R, McPherson A, et al.: Blood. 2011;113:595-607.
54. Tandle AT, Sanghvi V, Saranath D.: Br J Cancer. 2001;84:739-742.
55. Tomka M. Cigánylét – műhelytanulmányok. MTA Politikai Tudományok Intézete. 1991.
56. Wu K, Su D, Lin K, Luo J, Au WW. Asian Pac J Cancer Prev. 2011;12(9):2237-2243.
57. Wu X, Zhao H, Amos CI, et al: J Natl Cancer Inst. 2002;94:681–90.
58. Xing D, Qi J, Miao X, et al: Int J Cancer. 2002;100:600–605.
59. Zhao B, Lee EJ, Wong JY, et al: Pharmacogenetics. 1995;5:275-280.

## VIII. Publications

### VIII.1. The thesis is based on the following publications

1. **Zs. Orsós**, I. Szanyi, A. Csejtej, I. Gerlinger, I. Ember, I. Kiss: Association of pre-miR-146a rs2910164 polymorphism with the risk of head and neck cancer. Anticancer Res. 2013;33(1):341-6. imp.f.: 1.7
2. **Zs. Orsós**, J. Béres, E. Marek, I. Ember, I. Kiss: Allelic polymorphisms in the Hungarian Roma population. Ethnicity & Health, közlésre elküldve

3. J. Cseh, E. Pázsit, **Zs. Orsós**, E. Marek, A. Huszár, S. Balogh, I. Ember, I. Kiss: Effect of glutathione-S-transferase M1 and T1 allelic polymorphisms on the HPV-induced cervical precancer formation. *Anticancer Res.* 2011. 31: 3051-3056, 2011. imp f.: 1.656
4. Á Ember, F Budán, G Nowrasteh, T Varjas, I Prantner, Gy Göbel, ÖP Horváth, L Illényi, J Cseh, P Perjési, **Zs Orsós**, P Gergely, K Fehér, I Ember, I Kiss: Application of molecular epidemiological biomarkers by monitoring the effects of treatment in colorectal cancer during follow-up study. *European Journal of Oncology.* 2011. 16:(2): 99-104.) imp. f.: 0.697
5. A. Csejtei, A. Tibold, Zs. Varga, K. Koltai, A. Ember, **Zs. Orsós**, G. Feher, OP Horvath, I. Ember, I. Kiss: GSTM, GSTT and p53 polymorphisms as modifiers of clinical outcome in colorectal cancer. *Anticancer Research.* 2008. 28: 1917-1922. imp.f.: 1.39, cit: 14
6. I. Kiss, **Zs. Orsós**, K. Gombos, B. Bogner, A. Csejtei, A. Tibold, Zs. Varga, E. Pázsit, I. Magda, A. Zólyomi, I. Ember: Association between allelic polymorphism of metabolizing enzymes (CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2E1, mEH) and occurrence of colorectal cancer in Hungary. *Anticancer Research.* 2007. 27: 2931-2938. imp.f.: 1.414, cit: 12
7. Kiss, Á. Németh, B. Bogner, G. Pajkos, **Zs. Orsós**, J. Sándor, A. Csejtei, Zs. Faluhelyi, I. Rodler and I. Ember: Polymorphisms of glutathione-S-transferase and arylamine N-acetyltransferase enzymes and susceptibility to colorectal cancer. *Anticancer Research.* 2004. 24: 3965-3970. imp.f.: 1.395, cit: 19
8. **Orsós Zs**, Szanyi I, Ember I, Kiss I: A mir 146A RS2910164 G/C allépolimorfizmus hatása a fejnyaki daganatok kialakulásának kockázatára. *Magyar Epidemiológia.* 2011. 8:(4) pp. 201-206.
9. Kiss I, Béres J, **Orsós Zs**, Sándor J, Ember I: Daganatok iránti egyéni érzékenységet befolyásoló allépolimorfizmusok vizsgálata magyarországi roma populációban. *Magyar Epidemiológia.* 2004. 1: 69-74.

## VIII.2. Other publications

10. F. Budán, I. Szabó, T. Varjas, G. Nowrasteh, T. Dávid, P. Gergely, Zs. Varga, K. Molnár, B. Kádár, **Zs. Orsós**, I. Kiss, I. Ember: Mixture of Uncaria and Tabebuia extracts are potentially chemopreventive in CBA/Ca mice – A long-term experiment. *Phytotherapy Research.* 2011. 25:(4): 493-500. imp.f.: 1.878
11. F. Budán, I. Szabó, Á. Ember, ÖP Horváth, L. Illényi, **Zs. Orsós**, A De Blasio, I. Magda, T. Gracza, P. Perjési, T. Dávid, G. Nowrasteh, I. Ember: Effect of Uncaria and Tabebuia extracts on molecular epidemiological biomarkers in patients with colorectal cancer. *Acta Alimentaria.* 2011. 40:(3): 356-363. imp. f.: 0.379
12. I. Kiss, A. Tibold, R. Halmosi, É. Bartha, K. Koltai, **Zs. Orsós**, L. Bujdosó, I. Ember: Enhancement of organ regeneration in animal models by a stem cell stimulating plant mixture. *Journal of Medicinal Food.* 2010. 13(3) 599-604.. imp.f.: 1.461
13. K. Gombos, T. Varjas, **Zs. Orsós**, É. Polyák, J. Peredi, Zs. Varga, G. Nowrasteh, A. Tettinger, Gy. Mucsi, I. Ember: The effect of aspartame administration on oncogene and suppressor gene expressions. *In Vivo.* 2007. 21: 89-92. imp.f.: 1.143

14. **Orsós Zs.**, Nádas E., Dávid T., Ember I., Kiss I.: A CoD tea fogyasztás hatása "short-term" tesztrendszerben onko és tumorszuppresszor gének expressziójára. Egészségtudomány. 2007. 50: 95-107.

**Impact factor (papers published and accepted for publication): 15,9**

### VIII.3. Book chapters

1. **Orsós Zs.**: Daganatok epidemiológiája. (XI/3. fejezet) In: Népegészségügyi Orvostan (szerk: Ember István, Kiss István, Cseh Károly). Dialóg Campus , 2013.
2. Kiss I., **Orsós Zs.**: Általános epidemiológia. (X. fejezet) In: Népegészségügyi Orvostan (szerk: Ember István, Kiss István, Cseh Károly). Dialóg Campus, 2013.
3. **Orsós Zs.**, Berényi K., Ember I.: A roma közösségek egészségi állapota. (XVI/6. fejezet) In: Népegészségügyi Orvostan (szerk: Ember István, Kiss István, Cseh Károly). Dialóg Campus , 2013.
4. Kiss I., **Orsós Zs.**, Gombos K., Prantner I., Szele E., Ember I.: Szűrés, szűrővizsgálatok (X/4. fejezet). In: Népegészségügyi Orvostan (szerk: Ember István, Kiss István, Cseh Károly). Dialóg Campus , 2013.
5. **Orsós Zs.**: A külső okból bekövetkezett halálozások epidemiológiája (XI/13. fejezet). In: Népegészségügyi Orvostan (szerk: Ember István, Kiss István, Cseh Károly). Dialóg Campus , 2013.

### VIII.4. Citeable abstracts:

1. **Zs. Orsós**, J. Béres, J. Sándor, I. Ember, I. Kiss: Allelic polymorphisms of metabolizing enzymes in hungarian roma population. Anticancer Research. Vol 24. (5D): 3587.
2. I. Kiss, **Zs. Orsós**, A. Csejtej, R. Schnábel, Zs. Faluhelyi, B. Bogner, J. Sándor, Á. Németh, I. Ember: Allelic polymorphisms of metabolizing enzymes modify the risk of colorectal cancer. Anticancer Research. Vol 24. (5D): 3536.
3. T. Varga, **Zs. Orsós**, Zs. Faluhelyi, A. Csejtej, I. Ember, I. Kiss: Effect of allelic polymorphysm of p53 tumor suppressor gene and vitamin-D receptor gene on individual susceptibility to breast cancer. Anticancer Research. Vol 24. (5D): 3663
4. Gy. Czakó, M. Varga, **Zs. Orsós**, Cs. Varga, I. Ember, I. Kiss: Effect of plant extract on the expression of oncosuppressor genes in mice. Anticancer Research. Vol 24. (5D): 3462.
5. F.T. Molnár, I. Kiss, Zs. Faluhelyi, **Zs. Orsós**, L. Bujdosó: Oncogene and tumor suppressor gene expression in different tissues of lung cancer patients. Hungarian Epidemiology. II. 1: S.58.
6. Gy. Czakó, M. Varga, **Zs. Orsós**, I. Kiss: In vivo gene expression effects of plant extract in mice. Hungarian Epidemiology. II. 1: S.33.

7. **Zs. Orsós**, E. Nádas, T. Dávid, I. Ember, I. Kiss: Effects of CoD extract on onco/tumor suppressor gene expression in mice. *International Journal of Molecular Medicine*. Vol. 16. (1): S66. 2005.
8. I. Kiss, **Zs. Orsós**, L. Szabó, I. Ember: In vivo effects of a plant extract (Flavin 7) on onco/tumor suppressor gene expression. *International Journal of Molecular Medicine*. Vol. 16. (1): S66. 2005.
9. **Zs. Orsós**, J. Béres, A. Csejtej, Zs. Faluhelyi, I. Ember, I. Kiss: Allelic polymorphism of the XRCC1 DNA repair gene in the Hungarian Roma (Gipsy) population. *International Journal of Molecular Medicine*. Vol. 18. (1): 358. 2006.
10. I. Kiss, **Zs. Orsós**, A. Csejtej, Zs. Faluhelyi, Zs. Varga, E. Pázsit, I. Ember: Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes affect the risk of colorectal cancer. *International Journal of Molecular Medicine*. Vol. 18. (1): 357. 2006.
11. A. Csejtej, A. Tibold, K. Koltai, Zs. Faluhelyi, **Zs. Orsós**, I. Kiss, I. Ember: Allelic polymorphisms as modifiers of colorectal cancer risk. *International Journal of Molecular Medicine*. Vol. 18. (1): 361. 2006.
12. **Zs. Orsós**, L. Szabó, K. Gombos, I. Ember, I. Kiss: Anticancer Effect of „Flavin 77”, a Plant Extract with High Phytochemical Content: An In Vivo Study with a Transplanted Hypernephroma. *Emirates Medical Journal*. Vol. 25. (1): 78. 2007.
13. I. Kiss, G. Pajkos, **Zs. Orsós**, K. Gombos, A. Tibold, Zs. Faluhelyi, Zs. Varga and I. Ember: Effect of p53 Allelic Polymorphism on the Prognostic Value of K-ras Point Mutations in Colorectal Cancer. *Emirates Medical Journal*. Vol. 25. (1): 90. 2007.
14. J. Cseh, I. Ember, **Zs. Orsós**, A. Tibold, Zs. Varga, E. Pázsit, I. Kiss: Effect of an allelic polymorphism in the dopamin receptor D2 gene on the risk of cervical cancer. *Anticancer Research* 28:5C, September-October 2008, 3248: A129
15. L. Szabó, I. Kiss, **Zs. Orsós**, I. Ember: Effect of Nano-Fruit-Café on the expression of oncogenes and tumor suppressor genes. *Anticancer Research* 28:5C, September-October 2008, 3274: A186
16. I. Kiss, **Zs. Orsós**, A. Tibold, Zs. Varga, J. Cseh, A. Csejtej, I. Ember: Low penetrance genetic susceptibility factors in human carcinogenesis. *Anticancer Research* 28:5C, September-October 2008, 3351: A345
17. A. Tibold, A. Csejtej, Zs. Varga, K. Koltai, Á. Ember, **Zs. Orsós**, I. Ember, I. Kiss: Allelic Polymorphisms as modifiers of clinical outcome in colorectal cancer. *Anticancer Research* 28:5C, September-October 2008, 3518: A677
18. **Zs. Orsós**, I. Kiss: Allelic polymorphisms and cancer susceptibility. *International Conference of Preventive Medicine and Public Health. Magyar epidemiológia*. VII. 4:
19. I. Szanyi, **Zs. Orsós**, P. Móricz, I. Ember, I. Kiss: Effect of UDP-glucuronyltransferase 1A1 allelic polymorphism on the risk of development and prognosis of head and neck cancers. *International Conference of Preventive Medicine and Public Health. Magyar epidemiológia*. VII. 4:
20. J. Cseh, **Zs. Orsós**, E. Pázsit, Z. Ozsváth, I. Ember, I. Kiss: Allelic polymorphisms as risk/prognostic factors in cervical cancer. *International Conference of Preventive Medicine and Public Health. Magyar epidemiológia*. VII. 4:

## **IX. Acknowledgement**

I would like to express the support and encouragement to my consultant, prof. dr. István Ember during my work and studies, and his help at the preparation of my thesis. Unfortunately professor Ember is not with us anymore, but I will always remember him with gratitude.

I would like to say thank you to the leader of my workgroup, professor István Kiss for being always there to help and support me during my career.

I would like to express my thanks to my family; they always believed in me and gave me strength through their love.

I would like to thank for the Roma samples to dr. Judit Béres, human geneticist.

I would like to thank for the help of Déri Tiborné in the laboratory work.

Last but not least I would like to express my deepest gratitude to the Hungarian Academy of Sciences, for giving me the first Roma Academic Stipend. This financial and moral honor was enormously important for me, during my work and my studies.